

**DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES COMPETENTES PARA LA
REPLICACIÓN DE PRIONES HUMANOS MEDIANTE LA
REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES
GENÉTICAMENTE SUSCEPTIBLES**

LUCÍA MAYELA GAYOSSO MIRANDA

LEIOA, 2016



NAZIOARTEKO
BIKANTASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL



Tesis Doctoral:

**DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES COMPETENTES PARA LA
REPLICACIÓN DE PRIONES HUMANOS MEDIANTE LA
REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES
GENÉTICAMENTE SUSCEPTIBLES**

LUCÍA MAYELA GAYOSSO MIRANDA

LEIOA, 2016

DIRECTORES:

**Dr. Joaquín Castilla Castrillón
Dra. Rosario Sánchez Pernaute**

TUTOR:

Dr. Félix M. Goñi Urcelay

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al CiCbioGUNE por la beca otorgada durante el primer año de ésta tesis, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (CVU/SICOB 357631/215563) por la beca que me permitió el desarrollo y conclusión de mis estudios doctorales.

Al Dr. Joaquín Castilla por darme la maravillosa oportunidad de realizar éste proyecto tan hermoso y descubrir el fascinante mundo de los priones, que sin lugar a duda fue una suerte por haber formado parte importante en la dirección de esta tesis doctoral, este proyecto no sería lo que es sin su apoyo científico. Gracias por haberme guiado a observar con una mirada científica a la PrP^C y PrP^{Sc}.

Gracias a mis compañeros de tesis: Saioa, Hasier y Chafik por todas las enseñanzas brindadas, sin lugar a duda fueron bastantes y muy diversas, lo pase muy bien con ustedes! A los nuevos integrantes doctorales Vanesa y Jorge, fue muy gratificante conocerles y les deseo mucho éxito en éste camino. Agradezco a todo el personal que ha trabajado en el laboratorio Mamen, Patricia, Carlos y Natalia, así como a los técnicos Alberto, Nagore, Patricia y Maite, que siempre dieron vida con sus cantos.

Al centro de Investigación CiCbioGUNE por todas las facilidades brindadas y por el uso de todas sus excelentes instalaciones, un lugar increíble y de referencia tecnológica. Gracias a todos los miembros de éste centro de investigación por su ayuda y amistad.

Agradezco al departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea y en especial al Dr. Félix Goñi por haber sido mi tutor y por toda la ayuda brindada en el ámbito administrativo.

Por otra parte, quiero agradecer infinitamente a la Dra. Rosario Sánchez (Charito) por haberme ayudado muchísimo en esta tesis. Has sido un pilar esencial y de suma importancia en ésta tesis. Por abrirme las puertas en tu laboratorio, lo he pasado increíble, una experiencia inigualable. Gracias por enseñarme, guiarme, aconsejarme y sostenerme a lo largo de cada una de las etapas que llevó este trabajo, por mostrarme el apasionante mundo de la neurología que hoy por hoy lo disfruto como el primer día. Por cada día que pasaba y me enseñaba cosas inimaginables, era un disfrute escucharte y hacerme de ellas; por todas nuestras

charlas llenas de risas, alegría, estrés, preocupación, llanto y hasta por los maravillosos momentos vividos por Skype y de salidillas por Donosti, echaré de menos esos fines de semana skypianos o whatsapianos. Te estaré eternamente agradecida. Mi admiración, cariño y respeto hoy y siempre.

Al Dr. Adolfo López de Munain, primeramente por darme la oportunidad de estar en el Centro de Investigación Biodonostia y por todas las facilidades otorgadas, que sin ello no hubiera sido posible hacer volar éste proyecto, gracias por haberme abierto las puertas a un templo de sabiduría inagotable he incalculable, aprendí muchas cosas científicas y personales, haciendo extremadamente enriquecedora mi visión hacia el conocimiento científico y de la vida; por tus charlas llenas de cariño y hasta paternidad, por tu preocupación y ocupación, por tus enseñanzas y valiosos consejos, eres una gran fuente de inspiración y un ápice a seguir. Sin duda has marcado una gran pauta en mi vida. ¡Mil gracias, te estoy eternamente agradecida!

Al centro de investigación Biodonostia, por todas las facilidades concedida para el uso de todas las área instalaciones, sin duda fue mi segundo hogar científico. Gracias a todos los Investigadores principales por los buenos momentos vividos y por siempre tener predisposición a contestar a mis preguntas y ayudarme hasta en lo más mínimo, gracias a l@s post doctorales por transmitirme sus conocimientos, en especial a Estefanía Carrasco, Ana Aiastui, Maria Goicoechea, a mis MIIIIIIIIIIIIIIIIIIII@S y casi herman@s Garazi, Iván, Ander Anasagastegui, Ander Arbelaiz, gracias por las incontables horas hombro con hombro y ya no decir de los fines de semanas que pasábamos currando pero siempre riendo y pasándolo bien, gracias por su infinito apoyo, escucha y por siempre darme la energía necesaria aun y cuando ya estaba en Bilbao, gracias por formar parte esencial de mi vida, los quiero muchisisisimo y como los echaré de menos. A Alba por estar al pendiente de mí y apoyarme desde el primer día en BD, hiciste una gran proeza científica en mi persona. A todas las técnicos de laboratorio de las tres plantas gracias por todo y las echare de menos. A mis PRIIIIIIIIIINS que a nivel personal y laboral me aportaron muchísimo, siempre tuvieron una respuesta a mis preguntas, una hermosa mirada, palabra, abrazo, beso, sonrisa, o atención hacia mi persona, son invaluable y hoy por hoy podría decir que estoy agradecida con el destino por esta magnífica oportunidad de vivir esta etapa de mi vida a su lado.

Al Centro de Investigación en Medicina Regenerativa INBIOMED, gracias por todas las facilidades brindadas. Primeramente mi reconocimiento especial y gratitud a la post doctoral que hoy por hoy admiro en demasía y a quien estaré eternamente agradecida a Raquel López de Maturana, tus enseñanzas son invaluable, siempre tuviste tiempo para contestar mis incalculables preguntas y dudas, por enseñarme y orientarme en esta tesis, por siempre estar atenta a ella y porque la viste nacer, crecer y evolucionar hasta lo que es el día de hoy. Mi eterno agradecimiento y cariño mi ¡Santa Reichelita hermosa! Te quiero mucho. A Julio, Amaya y Nerea que fueron acompañantes y guías en este maravilloso mundo de las *hiPSC* y neuronas, como olvidar todas sus enseñanzas antes de zarpar y ya estando en aguas de éste gran proyecto. A Amayi gracias por tu completa disposición las 24 horas del día. Por todos los momentos vividos y compartidos con todos ustedes mí más sincero agradecimiento, mi vida no alcanzaría para decirles día con día gracias por todo.

A mis papas

A ustedes dos bellos báculos que me dieron la existencia y que al paso de ella siempre me han otorgado su apoyo incondicional. Esta tesis la comparto fielmente con ustedes ya que cada hoja que recorre este trabajo experimentó su amor y comprensión arropándome en su regazo y besándome simbólicamente a un habiendo un océano de por medio; por hacer magia con sus palabras y actuando afablemente para que los tuviera próximos a mi alma y mi mente, siempre siendo ese arquetipo de tenacidad, perseverancia y sencillez, por todo eso y más, me postro a sus pies con toda mi gratitud y amor de hija, sin duda una gran fortuna que sean mis papas, los adoro y admiro con toda mi alma.

A mis hermanos

A mis 5 maravillosos tesoros porque estoy segura que sin ustedes este ciclo de mi vida no hubiera sido lo mismo, gracias por todos estos años de comprensión, cariño, palabras, ánimos y buenos momentos a través de la distancia y el tiempo, por mantenerme lo más cerca posible a mis raíces mexicanas y anclada a una realidad paralela. ¡Sin duda mi máximo tesoro presente y futuro, los adoro!

A mi sobrino Frank, eres la nueva luminiscencia y fundamento en la semblanza familiar, que sin lugar a dudas marcaste desde hace unos meses una maravillosa pauta en esta etapa de mi vida, formándote en el vientre materno mientras yo realizaba esta tesis, sin duda ya eres una de mis más grandes ilusiones, te quiero.

A mis abuelitos, tí@s y prim@s

Por su apoyo, sonrisas y amor a lo largo de estos años, un gran ejemplo de fortaleza, humildad y tenacidad. Los quiero con toda el alma.

A mi FAMILIA VASCA, los abrazo y beso con infinito agradecimiento por todo el amor filial dado a lo largo de estos años, que desde el primer día hasta hoy han sido esa magnífica familia que no cualquiera tiene, me siento tan afortunada de ustedes que la vida no me alcanzará para agradecerles todo lo que han compartido y hecho por mí. Gracias a Borja, Iban y Mai, Inés y Javi, toda las chic@s exgamesa, a mis primos (Lei y Tommy), hermanita menor (Silvy), hermanita mayor (Pily), Aitas (Tomas y Carmele; Carlos y Pily; José y Loli), a Patri, Dianis, Hanny, Sandy, Nago, Nere, Eunate, Iraire, Luchy, Olgui, Gussepe, Eloy y tod@s mis amigas de las arenas, por SER MIS ANGELES GUARDIANES y hacerme sentir en cada momento como parte de su familia, esas navidades, años nuevos y momentos vividos día a día a su lado, sin duda han hecho brotar un manantial de felicidad y profundo respeto hacia todos ustedes mi gran familia. Ver a muchas de ustedes realizarse como espos@ o madre/padre ha sido una gran suerte. A mi vida le han dado unos matices invaluable, los quiero y querré por siempre. P.D. Creo que ya son más mexicanos que hace unos años y saben que volveré cada vez que pueda, porque no puedo estar lejos de ustedes mi gran familia vasco-mexicana.

A la Dra. Caballero, Dra. Ma. Ángela, Dra. Landa, Dr. Cuevas, Dra. Claudia Angélica y Dra. Trón por todo su cariño y apoyo incondicional dado desde mí entrada a la universidad y a lo largo de estos años. A mi director de carrera Dr. Rosiles, por haberme guiado durante la tesis y aconsejado el emprender mi camino en este mundo de la ciencia, mil gracias, te quiero mucho. Al Dr. Pedro S. por haberme permitido trabajar más a fondo en el mundo de las zoonosis y guiado en todo momento durante el Máster, sin duda como científico y amigo; así como tu familia son muy importantes para mí y agradezco todo el apoyo y cariño brindado, los quiero. A todas mis amistades mexicanas por su cariño, atenciones y por estar ahí a lo largo de éstos años, en especial a Doris, Miry, Viky, Ces, Betty y todas mis amistades de Ciudad Universitaria MIL GRACIAS.

SUMMARY/ RESUMEN

SUMMARY

DEVELOPMENT OF COMPETENT CELL LINES FOR HUMAN PRION REPLICATION BY REPROGRAMMING FIBROBLAST OF PATIENTS GENETICALLY SUSCEPTIBLE

The transmissible spongiform encephalopathies (TSE) or prionopathies are lethal neurodegenerative diseases affecting humans and animals with no therapeutic option. TSE are characterized by long incubation periods and a progressive and irreversible neurodegeneration. Prionopathies are distinguished by the presence of prions, misfolded isoforms of the cellular prion protein with replicative and infective capacity, that are toxic for neurons and the cause of the characteristic neurodegeneration of these pathologies. In some cases, the misfolding of the prion protein is related to the acquisition of spontaneous or inherited mutations in the prion protein gene.

In recent years a great effort has been directed to the development of cellular models capable to replicate human prions *in vitro*. However, these attempts have not succeeded, presumably because of some kind of transmission barrier.

Currently, since human induced pluripotent stem cells (*hiPSC*) can be differentiated to obtain neuronal cell cultures, *hiPSC* have been started to be used for the *in vitro* modeling of several neurodegenerative diseases. Therefore, we hypothesized that *hiPSC*-derived neurons could be used for the development of a cellular model for human prion infection. *hiPSC*-derived neurons from patients with inherited prionopathies could be more susceptible to *in vitro* prion propagation given that mutations in the prion protein seem to increase the susceptibility to prions infection. To test this hypothesis, we obtained neurons from *hiPSC* reprogrammed from fibroblasts obtained from a familiar type of Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) carrying the Y218N mutation in the *PRNP* gen and a healthy control. Following a forebrain neural differentiation protocol, we obtained neural populations that could be maintained in culture for several months. Both Y218N and control-derived neurons exhibited a robust expression of the cellular prion protein that increased over time, but proteinase K resistant forms of PrP were never detected. Notwithstanding, in the Y218N derived cell cultures, we observed an increase in reactive glial cells and, at the late neuronal differentiation phase, increased apoptosis as well as a reduction in the expression of mature neuronal markers

with Tau hyperphosphorylation. Interestingly, these features are reminiscent of the neuropathologic findings reported in the Y218N patient brain, and are thus possibly characteristic of this particular mutation.

We next examined the Y218N patient and the healthy donor derived differentiated neurons susceptibility to the infection by exposure to several human prion inocula, including Creutzfeldt-Jakob, familial fatal insomnia, GSS and non-human scrapie brain homogenates. None of the prion inocula used in this study was propagated to the cultures (i.e. there was no induction of the proteinase K PrP resistant form) in this model. However, the exposure to some inocula caused an increased presence of reactive glial cells, morphological changes in the glia, glial phagocytosis and subcellular Tau redistribution. These findings suggest that despite the absence of infection, the exposure was able to trigger a cytotoxic effect that can accelerate the appearance of the pathologic phenotype in the mutant neurons.

For these reasons, we consider that these cortical neurons derived from a familiar prion disease *hiPSCs* can be useful for the study of the mechanisms involved in the pathogenesis of inherited prionopathies, including the role of glial cells, the toxicity in the presence of infectious inocula and the aggregation of Tau and its possible cytotoxic effect.

RESUMEN

DESARROLLO DE LÍNEAS CELULARES COMPETENTES PARA LA REPLICACIÓN DE PRIONES HUMANOS MEDIANTE LA REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES GENÉTICAMENTE SUSCEPTIBLES

Las enfermedades espongiformes transmisibles (EETs) o enfermedades priónicas son un grupo de enfermedades neurodegenerativas mortales que afectan a seres humanos y animales, para las que no existe terapia. Se caracterizan por presentar largos periodos de incubación y cursan con una neurodegeneración progresiva e irreversible. Las prionopatías se distinguen por la presencia de priones, isoformas mal plegadas de la proteína priónica celular con capacidad replicativa e infectiva, que es tóxica para las neuronas y causa la degeneración característica de estas patologías. En algunos casos el mal plegamiento de la proteína priónica se produce por la adquisición de diferentes mutaciones en la proteína priónica celular, espontáneas o heredadas.

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar modelos celulares en los cuáles sea posible obtener la replicación de priones humanos *in vitro*. Sin embargo, estas iniciativas no han tenido éxito, debido presumiblemente a la presencia de algún tipo de barrera a la transmisión.

Recientemente se han comenzado a utilizar las células madre pluripotentes inducidas (*hiPSC*) para modelar distintas enfermedades neurodegenerativas *in vitro*, dado que a partir de estas células es factible obtener cultivos de neuronas humanas. Por ello, hipotetizamos que sería posible desarrollar un modelo celular de infección por priones humanos utilizando neuronas diferenciadas de *hiPSC*. Dado que las mutaciones en la proteína priónica parecen aumentar la susceptibilidad pensamos que las neuronas derivadas de *hiPSC* de pacientes con prionopatías hereditarias podrían ser más fácilmente infectadas *in vitro*. Para testar nuestra hipótesis decidimos obtener neuronas derivadas de *hiPSC* humanas reprogramadas a partir de fibroblastos provenientes de un paciente con la prionopatía de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) de tipo familiar, portador de la

mutación Y218N en el gen *PRNP* y un donante sano. Utilizando un protocolo de inducción neural y diferenciación telencefálica obtuvimos poblaciones neuronales humanas que pueden mantenerse en cultivo durante varios meses. Estas neuronas mostraron una expresión robusta y mantenida de la proteína priónica celular, tanto las células Y218N como las control, y en ningún caso presentaron formas de PrP resistentes a proteinasa K. Sin embargo, si observamos una mayor presencia de células de la glía reactivas y una mayor apoptosis en la fase de diferenciación neuronal tardía, así como una disminución en la expresión de marcadores neuronales maduros y un mayor nivel de Tau hiperfosforilada en los cultivos de células Y218N. Estos rasgos son reminiscentes de los hallazgos neuropatológicos reportados en el cerebro de los pacientes, pudiendo ser considerados, por tanto, asociados a la mutación Y218N.

En segundo lugar, quisimos evaluar la susceptibilidad de las neuronas diferenciadas del paciente Y218N y el donante sano a la infección con varios inóculos priónicos humanos (Creutzfeldt-Jakob (*ECJ*), insomnio familiar fatal (*IFF*), *GSS* y no humanos (*scrapie*). Ninguno de los inóculos priónicos utilizados en este estudio se propagaron (i.e. indujeron la formación de PrP resistente a la digestión con PK) en ninguno de los modelos neuronales. Sin embargo, la infección de las células con algunos de los inóculos desencadenó una mayor presencia de células de la glía reactivas, cambios morfológicos en la glía, fagocitosis glial y apoptosis, así como redistribución subcelular de Tau. Estos hallazgos sugieren que los inóculos utilizados, a pesar de no ser infectivos, desencadenan un efecto citotóxico que en los cultivos Y218N puede adelantar y/o exagerar la aparición del fenotipo patológico.

Por todo ello, consideramos que las neuronas obtenidas mediante diferenciación cortical a partir de *hiPSC* de pacientes con enfermedad priónica familiar pueden ser muy útiles para el estudio de los mecanismos implicados en la patogénesis de las prionopatías hereditarias, incluyendo el papel de las células gliales, el estudio de la toxicidad en presencia de inóculos infecciosos y en la agregación de Tau y su posible efecto citotóxico.

ABREVIATURAS/GLOSARIO

μl	microlitros	
AD	del inglés, <i>Alzheimer disease</i>	
ADN	ácido desoxirribonucleico	
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario	
AF	adhesions focales	
ALK	inhibidor de la quinasa del linfoma anaplásico	
ANOVA	análisis de la varianza	
ARN	ácido ribonucleico	
ARNm	ARN mensajero	
BCA	ácido bicinconínico	
BPM	del inglés <i>bone morphogenetic proteins</i>	
C-1300	línea de glioblastoma	
CD	dicroísmo circular	
Cepas	22L	cepa de <i>scrapie</i> adaptada en ratón
	139A	cepa de <i>scrapie</i> adaptada en ratón
	Chandler	PrP ^{Sc} humana adaptada a ratón
	Fukuoka	PrP ^{Sc} humana adaptada a ratón
	ME7	cepa de <i>scrapie</i> adaptada en ratón
	RML	(cepa de <i>scrapie</i>) del inglés, <i>rocky Mountain Laboratory</i>
Chandler	PrP ^{Sc} humana adaptada a ratón	
CO₂	dióxido de carbono	
C-terminal	extremo carboxilo terminal de una proteína	
Cu²⁺	cobre	
Cx	cortical	
DCX	doblecortina	
DIF	diferenciación	
DIV	días <i>in vitro</i>	
Dpi	días post inoculación	
DMSO	dimetilsulfóxido	
DS	del inglés, <i>donkey serum</i> .	
ECJ	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	
ECJe	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica	
ECJg	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética	
ECJi	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica	
ECJv	variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	
EDC	enfermedad debilitante crónica en ciervos	
EEB	encefalopatía espongiiforme bovina	
EEF	encefalopatía espongiiforme felina	
EET/EETs	encefalopatía/s espongiiforme/s transmisible/s	
EETH	enfermedades espongiiformes transmisibles humanas	
ETV	encefalopatía transmisible del visón	
EUE	encefalopatía espongiiforme de ungulados exóticos	
Fe²⁺	hierro	
FGFb	del inglés, <i>Basic fibroblast growth factor</i>	

Fib	fibroblastos
FTIR	espectroscopia por infrarrojo con transformación de Fourier
Fukuoka	PrP ^{Sc} humana adaptada a ratón
g	fuerza centrífuga relativa
GAGs	glicosaminoglicanos
GFAP	del inglés, <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GPI	del inglés, <i>glycosyl phosphatidyl inositol</i>
GSS	síndrome de Gerstmann Sträussler-Scheinker
GSS-Y218N	inóculo de cerebro humano diagnosticado de GSS portador de la mutación Y218N
h	hora
HE	hematoxilina-eosina
hESC	del inglés, <i>human embryonic stem cells</i> .
hiPSC	del inglés, <i>human induced pluripotent stem cells</i>
HMSCs	del inglés, <i>human mesenchymal stem cells</i>
HRP	del inglés, <i>horseradish peroxidase</i>
Hu PrP^C	extracto de cerebro de humano sano
IF	inmunofluorescencia
IFF	insomnio familiar fatal
IFFe	insomnio familiar fatal esporádico
iN	del inglés, <i>induced neurons</i>
ITS	insulina-transferrina-selenio
kDa	kilodalton
KO	del inglés, knockout
KSR	del inglés, <i>knockout serum replacement</i>
	C-1300 línea de glioblastoma
	GT1 neuronas murinas hipotálamicas
	HaB células de hámster inmortalizadas espontáneamente
	HFF1 IRR del inglés, <i>human foreskin fibroblasts irradiated</i>
Líneas celulares	HaB células de Hámster inmortalizadas
	N2a línea celular de neuroblastoma de ratón
	N2a-PK1 células sub-clonadas de N2A
	NIE115 línea celular de neuroblastoma
	PC12 células de feocromocitoma de rata
	RK13 del ingles, <i>rabbit kidney cell line</i>
LTP	potenciación a largo plazo
M	molar
mA	mili amperios
MET	microscopía electrónica de transmisión
MFA	microscopía de fuerza atómica
mg	miligramos
min	minuto
ml	mililitro
MM	metionina-metionina
mM	milimolar

Mn²⁺	manganeso
MSC	del inglés, <i>mesenchymal stem cells</i>
MV	metionina-valina
MVBs	del inglés, <i>multivesicular vesicular bodies</i>
MVs	microvesículas
Mw	del inglés, <i>molecular weight</i>
n	número de casos
NCAM	del inglés, <i>neural cell adhesion molecule</i>
NEAA	del inglés, <i>non essential aminoacids</i>
NES	nestina
ng	nanogramos
NHP	del inglés, <i>non human primate</i>
nm	nanómetro/s
NMR	del inglés, <i>nuclear magnetic resonance</i>
NSC	del inglés, <i>neural stem cells</i>
ON	del inglés, <i>over night</i>
N-terminal	extremo amino-terminal
OSKM	cóctel de reprogramación
P	pase seriado
p/s	penicilina/ estreptomicina
p/v	peso/volumen
PBS	del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	PBS 1X + Tween-20 al 0.5%
PCR	del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	paraformaldehido
PK	proteínasa K
PMCA	del inglés, <i>Protein Misfolding Cyclic Amplification</i>
PRNP	del inglés, <i>PRioN Protein (gen)</i>
PrP	del inglés, <i>Prion protein</i>
PrP*	estado conformacional transitorio de la PrP, intermedio entre PrP ^C y PrP ^{Sc}
PrP²⁷⁻³⁰	PrP resistente a PK de 27-30 kDa
PrP^C	proteína prión celular
PrP^{res}	proteína prión resistente
PrP^{Sc}	proteína prión celular de <i>scrapie</i>
PVDF	polifluoruro de vinilideno
RE	retículo endoplásmico
REC	reciclaje endocítico
RIPA	del inglés, <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RMN	resonancia magnética nuclear
ROCK	del inglés, <i>Rho-associated protein kinase</i>
ROS	del inglés, <i>reactive oxygen species</i>
rpm	revoluciones por minuto
RT	retro transcripción
RT- PCR	del inglés <i>real time quantitative PCR</i>
s	segundo

SDS-PAGE del inglés, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SEM del inglés *standard error of the mean*

SFB suero fetal bovino

SLR sistema linforetico

SNC sistema nervioso central

SNP sistema nervioso periférico

S-S puente disulfuro

STI1 fosfoproteína inducida por estrés

SVZ del inglés, *subventricular zone*

TA temperatura ambiente

Tm temperatura de fusión

TNTs nanotubos

UPS del inglés, *ubiquitin-proteasome system*

vPSPr del inglés, *variably protease-sensitive prionopathy*

VV valina-valina

WB del inglés, *Western blot*

WT del inglés, *wild-type*

Zn²⁺ zinc

Tabla de los 20 aminoácidos junto con su abreviatura y código

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

ÍNDICE

SUMMARY	17
RESUMEN	19
ABREVIATURAS/GLOSARIO	21
ÍNDICE	27
LISTA DE FIGURAS	32
LISTA DE TABLAS	34
INTRODUCCIÓN	35
LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES (EETs)	37
BREVE HISTORIA DE LAS EETs	38
NATURALEZA DEL AGENTE INFECCIOSO	41
EL GEN <i>PRNP</i>	43
MODELO DE CONVERSIÓN DE PrP ^C A PrP ^{Sc}	44
• Modelo de conversión asistida por molde	44
• Modelo de Nucleación-Polimerización	45
CEPAS DE PRIONES	46
BARRERA DE TRANSMISIÓN	49
ESTRUCTURA DE LA PrP ^C Y LA PrP ^{Sc}	50
PrP ^{Sc}	51
TRAFICO CELULAR DE LA PrP ^C	55
ENFERMEDADES ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN HUMANOS	56
Clasificación de las enfermedades espongiformes transmisibles humanas	57
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS):	58
Insomnio familiar fatal (IFF):	59
Kuru	60
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)	61
<i>ECJ esporádica (ECJe)</i>	61
<i>ECJ hereditaria (ECJh)</i>	64
<i>ECJ iatrogénica y variante</i>	64
• Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (<i>ECJi</i>)	64
• Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (<i>ECJv</i>)	65
Prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (vSPPr):	66
POSIBLES FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA PrP ^C	67
PrP ^C y la regulación del ciclo celular y la proliferación	67
PrP ^C en la neurogénesis	68
PrP ^C en la sinapsis	69
PrP ^C y su función neuroprotectora	71
EXPRESIÓN TISULAR Y CELULAR DE PrP ^C	71
¿CÓMO LLEGA PrP ^{Sc} A INFECTAR EL SNC?	72
FORMAS DE PROPAGACIÓN CELULAR DE LA PrP ^{Sc}	75
Contacto célula-célula	75
Por exosomas	76
Microvesículas	76
Diseminación extracelular de formas truncadas	77
Nanotubos (TNTs)	77
MOLÉCULAS COFACTORES DE LA CONVERSIÓN DE LA PrP	79
Cofactores no metálicos para la conversión de priones	79
Iones metálicos como cofactores para la conversión priónica	79
MODELOS CELULARES DE INFECCIÓN	81
1.- Líneas celulares neuronales	83
2.- Cultivos primarios neuronales y otros	85
• Cultivos celulares gliales y mixtos	86
3.- Células troncales neurales y mesenquimales	87
• Cultivos primarios de células madre neuronales	87
• Cultivos de células madre mesenquimales (<i>MSC</i>)	88
4.- Células madre pluripotentes: <i>hESC</i> y <i>hiPSC</i>	91

• Desventajas del uso de las <i>hiPSC</i> como modelos de enfermedad.....	95
5.- Neuronas inducidas (iN).....	96
• Conversión directa de fibroblastos a neuronas.....	96
OBJETIVOS	99
MATERIALES Y MÉTODOS	103
Obtención de fibroblastos para la reprogramación celular.....	105
Historial del paciente a partir del cual se tomaron fibroblastos y se propagaron a <i>hiPSC</i> para su posterior diferenciación a neuronas telencefálicas.....	105
Informe de caso.....	105
TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES	106
Condiciones generales de mantenimiento de los cultivos celulares.....	106
Contaje celular.....	106
Cultivo de células somáticas (fibroblastos primarios).....	107
Cultivo de células nodriza (<i>feeders</i>).....	107
Irradiación de células nodriza (<i>feeders</i>).....	108
Generación de <i>hiPSC</i>	108
Reprogramación de fibroblastos a <i>hiPSC</i>	108
Caracterización de las líneas de <i>hiPSC</i>	109
Cultivo de <i>hiPSC</i>	109
Cultivo de <i>hiPSC</i> sobre <i>feeders</i>	109
Cultivo de <i>hiPSC</i> sobre Matrigel.....	110
Propagación de <i>hiPSC</i>	111
Propagación manual de <i>hiPSC</i>	111
Propagación enzimática de <i>hiPSC</i>	111
Diferenciación de <i>hiPSC</i> a neuronas corticales.....	112
Obtención de pellets celulares a lo largo de la diferenciación neuronal.....	113
ENSAYO DE INFECTIVIDAD CON PRIONES	114
Preparación de inóculos (homogeneizado de cerebro al 10%).....	114
Detección de los niveles de PrP ^{Sc} presente en los inóculos.....	114
Ensayos de infectividad en neuronas corticales.....	115
Inoculación de neuronas corticales con homogeneizados de cerebros de pacientes con EETs (inóculos de PrP ^{Sc}).....	115
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	116
Extracción de proteína total.....	116
Cuantificación de proteína total.....	116
Análisis de expresión de PrP ^C en neuronas derivadas de <i>hiPSC</i>	117
Estudio de resistencia de la PrP ^C a la digestión con proteinasa K (PK) en neuronas corticales basales.....	117
Detección de proteínas mediante la técnica de <i>Western blot</i>	118
• Preparación de muestras proteicas.....	118
• Electroforesis y transferencia a membrana.....	118
• Incubación de membranas con anticuerpos primarios y secundarios.....	119
• Detección y visualización por imagen de bandas inmunoreactivas.....	119
Extracción de ARN total.....	119
RT-PCR cuantitativa.....	120
Inmunofluorescencia y microscopia confocal.....	121
• Inmunofluorescencia (IF).....	121
• Microscopia confocal.....	121
Cuantificación de células positivas para GFAP y DCX y de apoptosis celular.....	122
Transformación y análisis de datos.....	123
RESULTADOS	125
Caracterización de las neuronas derivadas de <i>hiPSC</i> con la mutación Y218N.....	127
Derivación de neuronas telencefálicas a partir de <i>hiPSC</i>	127
Diferenciación de <i>hiPSC</i> a neuronas telencefálicas y caracterización a lo largo del tiempo.....	128
Perfil transcripcional de neuronas telencefálicas.....	132
Estudio de los niveles de expresión de PrP ^C en neuronas telencefálicas.....	133

Análisis de PrP ^{Sc} a lo largo de la diferenciación neuronal.....	136
ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL FENOTIPO ASOCIADO A LA MUTACION Y218N EN NEURONAS	
TELENCEFÁLICAS	138
Análisis de la expresión de <i>DCX</i> y <i>GFAP</i> a lo largo del tiempo	138
Niveles de expresión de <i>MAP2</i> , <i>VGLUT1</i> y <i>MAPT</i> a lo largo del tiempo	141
ENSAYO DE INFECTIVIDAD	146
Detección de los niveles de PrP ^{Sc} presente en los inóculos	146
Ensayo 1 en neuronas jóvenes.....	147
Ensayo 2 en neuronas jóvenes.....	151
Ensayo 3 en neuronas en estadios más avanzados de maduración	153
Análisis de la presencia de cambios morfológicos en cultivos inoculados con priones.....	155
Expresión de Tau.....	161
DISCUSIÓN	167
Aplicación de las neuronas derivadas de <i>hiPSC</i> como modelo de prionopatías hereditarias:	169
Ensayos de infectividad en los cultivos neuronales:	170
Ventajas y limitaciones del modelo celular:	174
Ventajas observadas en nuestro trabajo	176
Aspectos a considerar en un futuro:	178
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	185
ANEXOS	209

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características histopatológicas de las EETs.....	38
Figura 2. Encefalopatías espongiformes transmisibles a lo largo de la historia.....	41
Figura 3. Localización del gen <i>PRNP</i> que codifica a la PrP en humanos.	44
Figura 4 Modelos de conversión de PrP ^C a PrP ^{Sc}	46
Figura 5. Estructura proteica primaria de la proteína priónica humana (PrP ^C).	51
Figura 6. Representación gráfica de distintos modelos de estructura molecular de los agregados de PrP ^{Sc} ... 54	
Figura 7. Ciclo celular de la proteína priónica celular (PrP ^C).	56
Figura 8. Mutaciones puntuales relacionadas con las enfermedades priónicas de tipo genético en la proteína priónica humana.....	58
Figura 9. Posibles funciones fisiológicas de la PrP ^C	67
Figura 10. Fases de la propagación de priones en el organismo.....	74
Figura 11. Mecanismos propuestos para la propagación de priones por contacto célula-célula.....	78
Figura 12. Moléculas asociadas con la interacción de PrP en la membrana plasmática y espacio extracelular.	80
Figura 13. Reprogramación de fibroblastos a <i>hiPSC</i>	93
Figura 14. Representación esquemática de la reprogramación de fibroblastos control y portadores de la mutación Y218N a <i>hiPSC</i>	109
Figura 15. Morfología de <i>hiPSC</i> post- descongelación y cultivo sobre <i>feeders</i> HFF1 IRR para su mantenimiento y expansión.	110
Figura 16. Morfología de <i>hiPSC</i> cultivadas sobre la matriz de Matrigel (Matrigel [®] Matrix, Corning [®] , dilución 1:40) para su mantenimiento y expansión.	111
Figura 17. Representación esquemática de las etapas de diferenciación neuronal de tipo cortical a partir de <i>hiPSC</i> control y portadoras de la mutación Y218N.	123
Figura 18. Representación esquemática de las etapas de preparación de los inóculos.	124
Figura 19. Representación esquemática de las etapas de inoculación con distintos tipos de inóculos.	124
Figura 20. Diferenciación de <i>hiPSC</i> a neuronas telencefálicas.	128
Figura 21. Caracterización de neuronas telencefálicas a través del tiempo.....	131
Figura 22. Perfil transcripcional en cultivos de células control y Y218N en las tres etapas de maduración neuronas.	133
Figura 23. Análisis de expresión de PrP ^C en neuronas derivadas a partir de <i>hiPSC</i> -control y mutadas (Y218N) a través del tiempo.....	135
Figura 24. Estudio de resistencia a PK en extractos celulares de neuronas control y mutadas.....	137
Figura 25. Perfil transcripcional de <i>DCX</i> y <i>GFAP</i> a lo largo del tiempo en neuronas telencefálicas en condiciones basal.....	138
Figura 26. Caracterización de <i>DCX</i> y <i>GFAP</i> a lo largo del tiempo en neuronas telencefálicas en estado basal.	140
Figura 27. Apoptosis.....	141
Figura 28. Expresión de MAP2, VGLUT1, Tau a lo largo del tiempo en neuronas telencefálicas en estado basal.	143
Figura 29. Análisis de expresión de Tau en neuronas derivadas a partir de <i>hiPSC</i> -control y mutadas a través del tiempo.....	145
Figura 30. <i>Western blot</i> de cerebros infecciosos.....	147
Figura 31. Ensayo de infectividad en neuronas jóvenes Y218N inoculadas a DIV 30 con inóculos infecciosos de origen cerebral.....	149
Figura 32. Ensayo de infectividad en neuronas jóvenes control inoculadas a DIV 40 con inóculos infecciosos de origen cerebral mediante <i>WB</i>	150

Figura 33. Detección de las formas de PrP resistentes a PK en extractos celulares de neuronas control y mutadas (DIV 60) inoculadas con distintos inóculos de <i>ECJ</i> (8.2 y 6.3), GSS-Y218N y <i>scrapie</i> mediante WB.....	152
Figura 34. Ensayo de infectividad en neuronas control en etapa avanzada de maduración <i>in vitro</i> (DIV 80) con inóculos infecciosos de origen cerebral.....	154
Figura 35. Análisis de expresión de PrP ^C , DCX, GFAP en neuronas jóvenes Y218N inoculadas con distintos priones (Inoculación VI).....	156
Figura 36. Análisis de expresión de PrP ^C , DCX y GFAP en neuronas jóvenes control inoculadas con distintos priones (Inoculación V).....	158
Figura 37. Análisis de expresión de PrP ^C , DCX y GFAP en neuronas jóvenes control inoculadas <i>scrapie</i> (Inoculación V).....	159
Figura 38. Análisis de expresión de PrP ^C , DCX y GFAP en neuronas inoculadas a DIV 80 con distintos priones (Inoculación V).....	160
Figura 39. Análisis de expresión y distribución de Tau en neuronas jóvenes Y218N inoculadas a DIV 30 con distintos priones (Inoculación VI).....	162
Figura 40. Análisis de expresión y distribución de Tau en neuronas control inoculadas a DIV 40 con distintos priones (Inoculación V).....	163
Figura 41. Análisis de expresión y distribución de Tau en neuronas control inoculadas a DIV 80 con distintos priones (Inoculación VI).....	164

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de las encefalopatías espongiformes transmisibles que afectan a humanos y animales.	39
Tabla I.I Encefalopatías espongiformes transmisibles descritas en los humanos.	39
Tabla I.II Encefalopatías espongiformes transmisibles descritas en los animales.	39
Tabla II. Líneas neuronales.	90
Tabla II.I. Modelos de cultivos de células susceptibles a agentes de la encefalopatía espongiforme transmisible.	90
Tabla II.II. Vías de difusión de priones en cultivo celular.	91
Tabla III. Medios de cultivo celular.	211
Tabla III.I Medio de cultivo para fibroblastos de prepucio humano (HFF1), fibroblastos portadores de la mutación Y218N y fibroblastos de donante sano.	211
Tabla III.II Medio de cultivo para <i>hESC</i>/<i>hiPSC</i>.	211
Tabla III.III Medio de inducción neuronal.	211
Tabla III.IV Medio de diferenciación neuronal (Medio N2B27).	211
Tabla IV. Líneas de fibroblastos.	212
Tabla IV.I Fibroblastos utilizados como control a la expresión de PrPC y de la diferenciación neuronal, así como células alimentadoras y de soporte.	212
Tabla V. Inóculos infecciosos.	212
Tabla V.I Inóculos obtenidos a partir de homogeneizados de tejido encefálico post-mortem al 10% (p/v) de pacientes que habían desarrollado alguna EET.	212
Tabla VI. Tampón de RIPA.	212
Tabla VI.I Tampón de RIPA. Tris HCl (hidrocloruro de Tris); NaCl (Cloruro de sodio); NO-40: Nonidet P-40 (octil phenoxypolyethoxylethanol); EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.	212
Tabla VII. Proteínas analizadas mediante WB e IF.	213
Tabla VII.I Proteínas no neuronales (estructurales, gliales) y neuronales (maduración temprana, intermedia y tardía) para el análisis mediante la técnica de WB.	213
Tabla VII.II Proteínas no neuronales (estructurales, gliales) y neuronales (maduración temprana, intermedia y tardía) para el análisis mediante la técnica de IF.	213
Tabla VIII. Anticuerpos para el análisis de proteínas mediante IF y WB.	213
Tabla VIII.I Anticuerpos primarios utilizados en WB.	213
Tabla VIII.II Anticuerpos primarios utilizados en IF y microscopia.	214
Tabla VIII.III Anticuerpos secundarios utilizados en WB.	215
Tabla VIII.IV Anticuerpos secundarios utilizados en IF.	215
Tabla IX. Genes marcadores de pluripotencia, regionales y de desarrollo neuronal analizados mediante qPCR.	215
Tabla IX.I Secuencias de las sondas (oligos) específicos utilizados para marcadores de pluripotencia.	215
Tabla IX.II Secuencias de las sondas (oligos) específicos utilizados para caracterizar el perfil transcripcional de genes regionales y de desarrollo en neuronas.	216

INTRODUCCIÓN

LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), también conocidas como enfermedades priónicas, son un grupo de enfermedades neurodegenerativas poco frecuentes y con un pronóstico inevitablemente fatal que afectan al ser humano y a algunos animales. La transmisibilidad de las EETs es una de las características típicas de estas enfermedades, lo que en ocasiones implica un riesgo para la salud humana y animal.

El interés de este campo queda subrayado por haber sido objeto del reconocimiento con dos premios novel en poco más de dos décadas, uno en 1976 al Dr. Carleton Gajdusek, por sus estudios sobre la enfermedad de kuru (Gajdusek, Gibbs et al. 1966) y otro al Dr. Stanley B. Prusiner en 1997 por el descubrimiento del agente causal de la enfermedad, una partícula puramente proteica a la que denominó “prión” (Prusiner 1982).

El trabajo de Prusiner provocó un profundo debate entre la comunidad científica dado que hasta el momento no se había descrito ninguna proteína con potencial infeccioso. De este modo, la importancia del estudio de las EETs radica, no sólo en el impacto económico, político y social que han generado en las últimas décadas en Europa, Asia y Norteamérica, sino también en el interés intrínseco que suscita para la ciencia este enigmático agente patógeno.

Aunque existen rasgos distintivos asociados a los diferentes tipos de EETs, todas ellas tienen en común un largo periodo de incubación, cursar con trastornos neurológicos progresivos acompañados de déficits cognitivos, sensoriales y motores, y no generar respuesta inmunitaria ni inflamatoria (Prusiner 1998). Desde un punto de vista neuropatológico, las EETs provocan pérdida neuronal, gliosis astrocítica, microgliosis y cambio espongiforme por vacuolización (**Figura 1**), siendo este último el rasgo más distintivo en este grupo de enfermedades. Sin embargo, el fenómeno que se considera crucial en el inicio y desarrollo de las enfermedades priónicas es la propagación del prión, así como su tendencia a agregarse extracelularmente (DeArmond and Prusiner 2003).

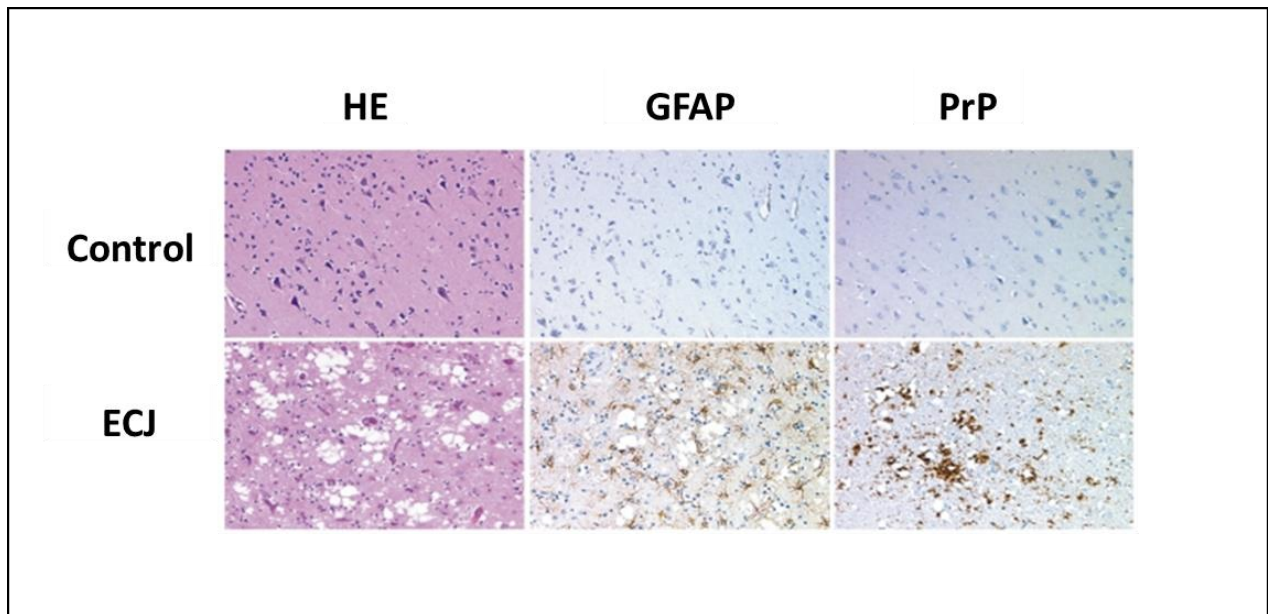


Figura 1. Características histopatológicas de las EETs. Análisis histológico e inmunohistoquímico de muestras de córtex frontal de paciente sano (fila superior) y paciente con *ECJ* (fila inferior). Las secciones han sido procesadas para hematoxilina – eosina (HE, izquierda), con anticuerpos contra la proteína ácida fibrilar glial (*GFAP*, centro) y con anticuerpos contra la proteína priónica (PrP, derecha). El marcaje HE exhibe una acentuada muerte neuronal y espongiosis mientras que el marcaje con *GFAP* exhibe una marcada proliferación de astrocitos reactivos (gliosis). El marcaje de PrP, muestra un depósito de PrP a nivel perivacuolar en las muestras de *ECJ*. Adaptado de (Aguzzi, Montrasio et al. 2001).

BREVE HISTORIA DE LAS EETs

Entre las EETs se incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (*ECJ*), el Insomnio Familiar Fatal (IFF) (Lugaresi, Medori et al. 1986, Medori, Tritschler et al. 1992), el síndrome de Gerstmann Sträussler-Scheinker (GSS) (Boellaard and Schlote 1980, Hsiao, Baker et al. 1989) y el kuru en los seres humanos. En animales las más frecuentes son *scrapie* en ovinos y caprinos, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) en ganado bovino (Wells, Scott et al. 1987), la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV) (Marsh and Hadlow 1992) y Enfermedad del desgaste crónico (EDC) en ciervos y alces (Williams and Young 1980). Además, se han descrito otras enfermedades priónicas en animales domésticos y animales en cautividad, como la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) o la Encefalopatía Exótica de ungulados (Jeffrey and Wells 1988, Kirkwood, Wells et al. 1990, Wyatt, Pearson et al. 1991) (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de las encefalopatías espongiformes transmisibles que afectan a humanos y animales.

Prionopatías en humanos			
Enfermedad	Huésped	Etiología probable	Año de descripción
Kuru	Humano	Adquirida (ECJe)	1957
ECJe	Humano	Idiopática	1920
ECJg	Humano	Genética (Mutaciones en el gen <i>PRNP</i>)	1924
GSS	Humano	Genética (Mutaciones en el gen <i>PRNP</i>)	1936
ECJi	Humano	Adquirida (ECJe)	1974
IFF	Humano	Genética (Mutaciones en el gen <i>PRNP</i>)	1986
ECJv	Humano	Adquirida (EEB)	1996
IFFe	Humano	Idiopática	1999
VPSPr	Humano	Idiopática	2008

Tabla II Encefalopatías espongiformes transmisibles descritas en los humanos. ECJe: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica; ECJg: ECJ genética; GSS: Enfermedad de Gerstmann-Sträussler- Scheinker; ECJi: ECJ iatrogénica; IFF: Insomnio familiar fatal; ECJv: nueva variante de ECJ; IFFe: Insomnio familiar esporádico; VPSPr: variably protease-sensitive priónopathy (Prionopatía variable sensible a proteasas). (Revisado de (Imran and Mahmood 2011b).

Prionopatías en animales			
Enfermedad	Huésped	Etiología	Año de descripción
<i>Scrapie</i>	Ganado caprino/ ovino	Infección con priones de origen desconocido	1732
ETV	Visonos	Infección con priones de origen ovino/ bovino	1947
EDC	Cérvidos	Infección con priones de origen desconocido	1967
EEB	Ganado vacuno	Infección con priones de origen desconocido	1986
EEU	Nyala / kudu	Infección con priones de origen EEB	1986
EEF	Felinos	Infección con priones de origen EEB	1990
NHP	Lémures	Infección con priones de origen EEB	1996

Tabla III Encefalopatías espongiformes transmisibles descritas en los animales. ETV: Encefalopatía transmisibles del visón; EDC: Enfermedad del desgaste crónico; EEB: Encefalopatía espongiforme bovina; EEU: Encefalopatía espongiforme de los ungulados; EEF: Encefalopatía espongiforme felina; NHP Encefalopatía espongiforme transmisible en primates no humanos (Revisado de (Imran and Mahmood 2011a).

La descripción de los primeros casos de una EET en Europa se remonta al año 1729 donde se nombró “tembladera” o “*scrapie*” a una enfermedad presente en cabras y ovejas, caracterizada por un rascado compulsivo del animal que parecía debida a una sensación de picor. En los años 30 esta enfermedad cobró gran interés como consecuencia de su transmisión experimental en el ganado ovino y caprino (Cuillé 1936). Dicha enfermedad ha sido utilizada como prototipo para el estudio de las EETs. Debido al largo periodo de incubación observado desde la inoculación hasta la manifestación de los primeros signos clínicos, Sigurdsson, en el año 1954 describió esta enfermedad priónica como una “infección causada por un virus lento” (Sigurdsson 1954). Hoy en día presenta una distribución mundial (Hadlow, Kennedy et al. 1982, Detwiler 1992, Schwartz and Schneider 2004), incluyendo Nueva Zelanda y Australia, donde se describieron los primeros casos de *scrapie* atípico en 2009 y 2010 respectivamente (Kittelberger, Chaplin et al. 2010).

Hasta principios del siglo XX no se describió la primera enfermedad priónica que afectaba a humanos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. El término de la enfermedad lo acuñó Spielmeyer en reconocimiento a las descripciones previas de pacientes con esta enfermedad realizadas por los doctores Creutzfeldt (Creutzfeldt HG 1920) y Alfons Maria Jakob quien en 1921 describió la demencia presenil pseudoesclerótica con focos diseminados de degeneración. Cuarenta años más tarde, se descubrió la enfermedad de kuru, donde comunidades enteras, especialmente mujeres y niños presentaban signos y síntomas clínicos característicos de la enfermedad, debido a la práctica de rituales funerarios de canibalismo que favorecían la transmisión de la enfermedad afectando a los sujetos que ingerían tejido del sistema nervioso infectado (mencionado por Gajdusek and Zigas 1957).

En 1959 se encontró una conexión entre el kuru y la *ECJ* cobrando importancia a nivel epidemiológico ya que experimentos realizados con chimpancés en los que se inocularon intracerebralmente extractos de cerebros de ganado afectado de *scrapie* (1959), así como de pacientes enfermos de kuru (1966) (Gajdusek 1977) y *ECJ* (1968) (Gibbs, Gajdusek et al. 1968), revelaron de forma inequívoca la transmisibilidad de estas enfermedades, que entonces se creían consecuencia de un “virus lento”.

Sin lugar a dudas, la enfermedad priónica que ha tenido mayor impacto y repercusión en la sociedad, tanto desde el punto de vista epidemiológico como económico, ha sido la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). La EEB fue identificada por primera vez en el año 1986

en el Reino Unido y rápidamente se convirtió en una epidemia en todo el Reino Unido y parte de Europa (Wilesmith, Wells et al. 1988, Anderson, Donnelly et al. 1996). Además esta epidemia fue la responsable de la aparición de una nueva forma de enfermedad priónica humana, la denominada variante de *ECJ* (*ECJv*), que surgió en el Reino Unido aproximadamente 10 años después del estallido de la epidemia de EEB (**Figura 2**).

Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs)

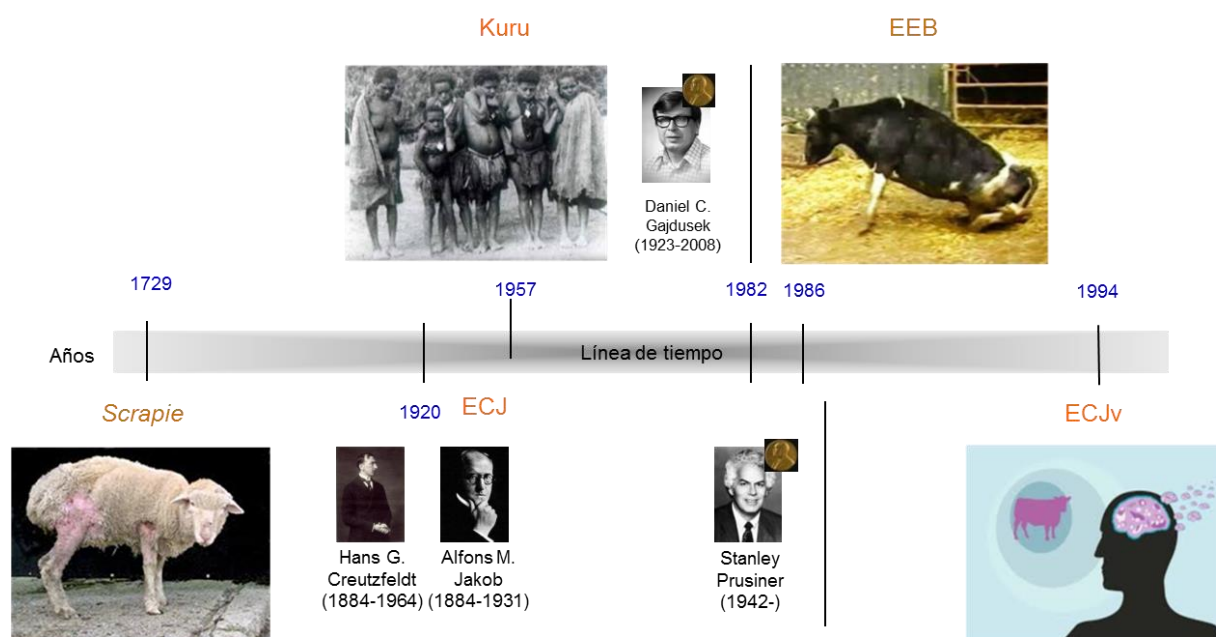


Figura 2. Encefalopatías espongiformes transmisibles a lo largo de la historia.

NATURALEZA DEL AGENTE INFECCIOSO

La naturaleza del agente infeccioso en los últimos cuarenta años ha sido un tema de continuas discrepancias. Al principio la evidencia de que el agente infeccioso mostraba una resistencia inusual frente al tratamiento por radiación ultravioleta o por nucleasas o tratamientos capaces de inactivar ácidos nucleicos, así como, por el hecho de no haberse podido aislar ninguna partícula vírica o por la ausencia de respuesta inmune llevaron a John S. Griffith a pensar que el agente infeccioso podría ser una proteína (Griffith 1967). No fue hasta el año 1982, cuando Stanley B. Prusiner, basándose en los estudios teóricos de Griffith, describió por

primera vez las nuevas propiedades del agente de *scrapie* que lo diferenciaba de los virus y viroides, bacterias, hongos o parásitos y propuso el término prión para denotar una pequeña partícula infecciosa proteica (*proteinaceous infectious particle*) que resistía la inactivación utilizando procedimientos que alteran los ácidos nucleicos (Prusiner 1982). Durante éste mismo año, Bolton en 1982 aisló la proteína priónica (PrP) a partir de homogeneizados de cerebros infectados. Esta proteína aislada se caracterizaba por ser resistente a proteasas y poseer un peso molecular de 27-30 KDa (denominada PrP²⁷⁻³⁰), observándose que se acumulaba en los cerebros de pacientes afectados y que en ocasiones se organizaba formando depósitos amiloideos (Bolton, McKinley et al. 1982). El aislamiento de la PrP²⁷⁻³⁰ permitió demostrar que esta proteína estaba codificada en un gen de copia única y que provenía de una molécula más grande con un peso molecular de 33-35 KDa (Oesch, Westaway et al. 1985).

Hoy en día la hipótesis de “sólo proteína”, que propone que la forma anormalmente conformada de la proteína del prión PrP^C es la PrP^{Sc}, siendo el único componente del agente infeccioso y que su propagación no implica la función de un ácido nucleico, está avalada por un extenso conjunto de datos. Inicialmente, tras no haberse identificado diferencias en la secuencia de aminoácidos entre PrP^C y PrP^{Sc}, se planteó que la PrP^{Sc} se podría generar a consecuencia de una modificación post-transcripcional de la PrP^C (Borchelt, Scott et al. 1990, Caughey and Raymond 1991). Sin embargo, dado que ni el estudio de modificaciones post-transcripcionales, ni el análisis de la secuencia de aminoácidos determinaron la existencia de diferencias entre ambas proteínas (Stahl, Baldwin et al. 1993), se propuso que la PrP^{Sc} actúa como molde que promueve la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} y que esta conversión implica exclusivamente un cambio conformacional. De este modo, al analizar la estructura de ambas isoformas mediante espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (*FTIR*, del inglés *Fourier transform infrared spectroscopy*) y mediante dicroísmo circular (*CD*, del inglés *Circular dichroism*) se demostró que la conversión a PrP^{Sc} está asociada con una disminución en el contenido de

hélices- α y un aumento en la proporción de láminas- β (Pan, Baldwin et al. 1993, Pergami, Jaffe et al. 1996).

El cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc} le confiere nuevas propiedades bioquímicas a esta última proteína, tales como la insolubilidad en detergentes no iónicos (Meyer, McKinley et al. 1986) y la resistencia parcial a la digestión con proteinasa K (PK) (Cohen and Prusiner 1998). El tratamiento con PK elimina aproximadamente los primeros 90 aminoácidos de la PrP^{Sc} dando lugar a la formación de un núcleo resistente de 27-30 KDa distinguible mediante la técnica de *Western blot* (WB) de la proteína celular completa (33-35 KDa). Hasta hoy, la presencia de este fragmento resistente a PK (PrP²⁷⁻³⁰) es el único marcador validado de la enfermedad. Por otra parte, también se ha reportado que el aumento en la proporción de láminas- β conduce a la agregación de la proteína anómala en fibras amiloideas resistentes a PK; dichas fibrillas al irse acumulando en el cerebro forman distintos tipos de depósitos (Fraser and Bruce 1973), que constituyen un marcador patognomónico de la enfermedad.

Un hito relevante, fue la determinación de que las formas familiares de las EETs están ligadas a mutaciones en el gen *PRNP* (Prusiner 1998, Collinge 2001). Este hallazgo supuso un apoyo importante para la hipótesis de “sólo proteína” dado que se observó que una vez que aparece la enfermedad genética, ésta se puede propagar de manera infecciosa. Hasta la fecha han sido identificadas más de 40 mutaciones en el gen de la PrP que dan a lugar al 10-15% de todas las enfermedades causadas por priones en humanos (revisado por Colby and Prusiner 2011, Jeong and Kim 2014)

EL GEN *PRNP*

La secuenciación de una fracción proteica de 27-30kDa (PrP²⁷⁻³⁰) presente en muestras de cerebro infectado por *scrapie* permitió la identificación del gen *PRNP*. Sorprendentemente, el gen que codificaba la PrP^{Sc} resultaba hallarse en el genoma del hospedador (Chesebro, Race et al.

1985, Oesch, Westaway et al. 1985). Tanto PrP^{Sc} como PrP^C compartían la misma secuencia de aminoácidos y eran codificadas por un mismo gen (Basler, Oesch et al. 1986).

La PrP^C, se encuentra activa en el cerebro y otros órganos. Es un gen de copia única, localizado en el brazo corto del cromosoma 20 en humanos y en el cromosoma 2 en ratones. *PRNP* contiene de 2 exones (en hámster, humanos y marsupiales) o 3 (en rata, ratón, ovinos y bovinos) en función de la especie. Se han descrito varios polimorfismos, tanto en el *PRNP* humano como de ratón, siendo el codón 129 crítico en la determinación de la susceptibilidad a desarrollar prionopatías humanas (Owen, Poulter et al. 1990, Gambetti, Parchi et al. 2003) (Figura 3).

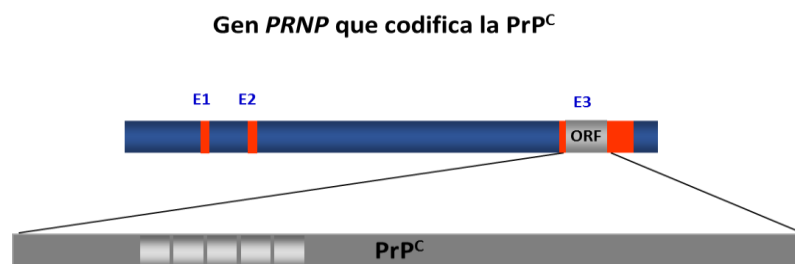


Figura 3. Localización del gen *PRNP* que codifica a la PrP.

MODELO DE CONVERSION DE PrP^C A PrP^{Sc}

El mecanismo preciso para la propagación y distribución de los priones *in vivo* no ha sido determinado hasta el momento. Sin embargo, el cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc} se considera un evento esencial en la replicación de los priones, proponiéndose dos modelos conformacionales de conversión para poder explicar el fenómeno de la replicación de los mismos:

- **Modelo de conversión asistida por molde**

Este modelo también es conocido como modelo heterodímero o modelo de plegamiento, descrito por Stanley Prusiner (Prusiner 1991). Tal y como se muestra en la **figura 4**, este modelo postula una interacción entre la proteína PrP^{Sc} y la PrP^C donde la PrP^{Sc} induce la transformación

de la PrP^C a una isoforma PrP^{Sc}, es decir la que la PrP^{Sc} actuaría como molde de la conversión. Este modelo está apoyado por estudios *in vitro* que demuestran que una estructura compuesta principalmente por hélices- α es capaz, espontáneamente, de convertirse en una estructura con contenido mayoritario de láminas- β (Weissmann and Aguzzi 1999, Satheeshkumar, Murali et al. 2004) (**Figura 4A**).

- **Modelo de Nucleación-Polimerización**

Este otro modelo propone que PrP^{Sc} podría existir junto con PrP^C con el equilibrio desplazado hacia PrP^C en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la inestabilidad intrínseca de PrP^{Sc} podría conducir a la agregación de este conformero en "semillas o núcleos" más estables que son propensos a incorporar otros monómeros, cambiando así el equilibrio hacia una acumulación de la isoforma patológica PrP^{Sc} (Caughey, Kocisko et al. 1995) (**Figura 4B**).

El proceso se caracteriza primero por una fase de latencia en la que varias moléculas de PrP^{Sc} monoméricas se agregan de manera altamente ordenada para formar un núcleo o una semilla infecciosa; la oligomerización inicial de la PrP^{Sc} ocurre muy lentamente. Este núcleo, una vez formado, lleva al reclutamiento de monómeros de PrP^C que, cada vez más rápido, adoptan la conformación de PrP^{Sc} y dan lugar a un agregado amiloideo con esta estructura cristalina formada y donde la PrP^{Sc} se estabiliza. Los agregados amiloideos se fragmentan y por lo tanto incrementan el número de núcleos que pueden reclutar un gran número de monómeros de PrP^{Sc}, favoreciendo la propagación del agente (Aranda-Anzaldo 1992). Esta teoría se apoya en modelos matemáticos (Masel, Jansen et al. 1999, Masel and Jansen 2001), en datos cuantitativos obtenidos de experimentos de conversión *in vitro* (Caughey, Kocisko et al. 1995, Masel and Jansen 2001), así como en la caracterización morfológica de los agregados de priones como polímeros no ramificados y de diámetro relativo constante (Prusiner, McKinley et al. 1983, Jeffrey, Goodbrand et al. 1995).

Ambos modelos coinciden en la necesidad de la presencia de PrP^C para que se pueda dar una infección por priones. Esta idea se corroboró con la generación de un modelo de ratón *knockout* (KO) para el gen *PRNP* que resultó ser resistente a este agente infeccioso (Bueller, Aguzzi et al. 1993, Weissmann, Bueller et al. 1994).

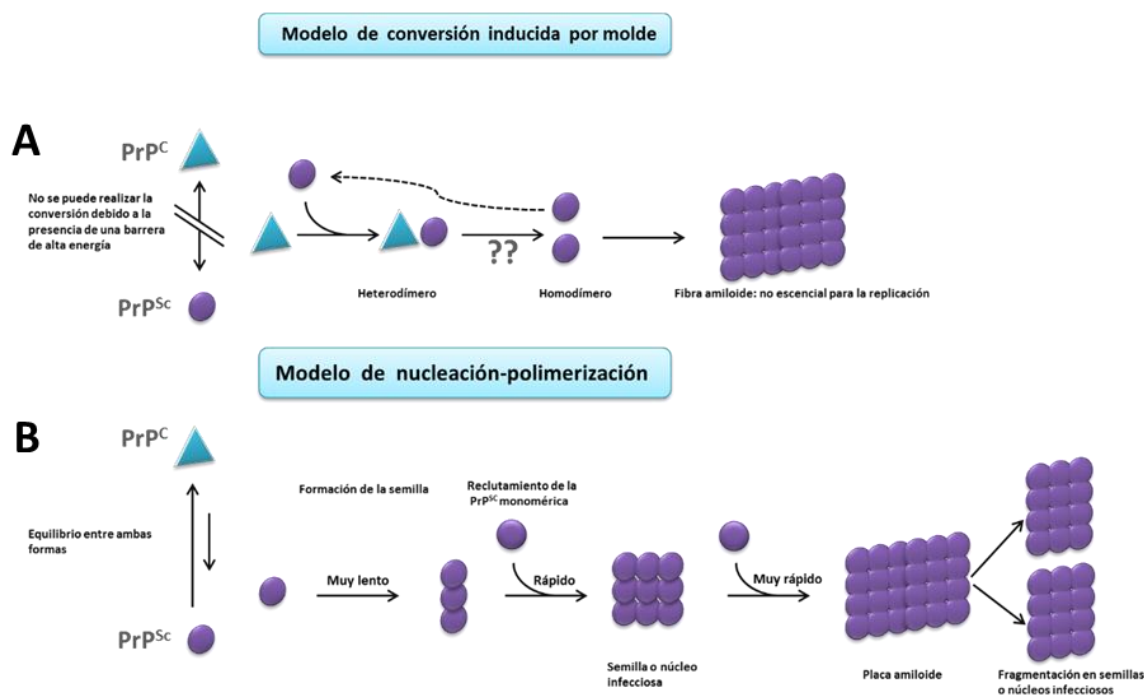


Figura 4 Modelos de conversión de PrP^C a PrP^{Sc}. A) Modelo de conversión inducida por molde. La conversión directa de PrP^C a PrP^{Sc} es muy poco probable por la barrera energética alta que se debe superar. En cambio, este salto energético puede disminuir en gran medida cuando la PrP^{Sc} se une a PrP^C actuando como molde para guiar el cambio conformacional entre las dos formas. B) Modelo de nucleación-polimerización. Hay un desequilibrio entre la PrP^C y la PrP^{Sc} donde la forma nativa está altamente favorecida. No obstante, la PrP^{Sc} va formando agregados que favorecen su reclutamiento, estabilización e incorporación creando agregados mayores (Modificado de (Aguzzi and Polymenidou 2004)).

CEPAS DE PRIONES

Uno de los fenómenos más misteriosos de la biología de los priones es la existencia de varias cepas distintas de priones. Siendo esta una de las razones por las que la hipótesis “sólo proteína” haya sido cuestionada durante años. La observación de que una cepa transmitida a una misma especie puede dar lugar a la generación de múltiples cepas de priones con idénticas secuencias de aminoácidos, ha sido causa de controversia en la comunidad científica.

El término de “cepa” se define como el agente infeccioso que, cuando se transmite a un hospedador idéntico, desarrolla después de cierto tiempo fenotipos de enfermedad priónica distintos al inóculo de partida y cuyas propiedades se mantienen a su vez inalteradas tras varios pases seriados (Aguzzi and Calella 2009).

Las cepas pueden reproducirse fielmente a expensas de la PrP^C del huésped (Bessen and Marsh 1992ab, Bessen and Marsh 1992, Telling, Parchi et al. 1996, Safar, Wille et al. 1998) dando lugar a distintos fenotipos de enfermedades priónicas, muy parecidas entre sí en cuanto a la sintomatología que desarrollan, así como, a los patrones de depósitos de proteína agregada, aunque mostrando mayores diferencias en el período de incubación, perfil de lesiones histopatológicas y a las zonas cerebrales por las cuales presentan un especial tropismo (Bruce, McConnell et al. 1991). El periodo de incubación y el perfil de lesiones son por tanto las características más importantes a tomar en cuenta para poder identificar, clasificar y diferenciar a las distintas cepas estudiadas hasta hoy (Bruce 2003).

Trabajos recientes en modelos de ratón indican que las diferentes cepas de priones se correlacionan con la sensibilidad de las fibrillas infecciosas a la desnaturalización *in vitro*, de forma que los priones menos estables son capaces de replicar y matar al huésped más rápidamente (Legname, Nguyen et al. 2006). Por otro lado, se conoce que el tratamiento con PK de muestras extraídas, genera núcleos PK-resistentes de dos tamaños distintos determinados por su movilidad electroforética (Bessen and Marsh 1994). Este procesamiento distintivo de dos proteínas con una idéntica secuencia de aminoácidos se puede explicar como una consecuencia de diferencias estructurales, de modo que el plegamiento diferencial permite que se expongan residuos de aminoácidos que de otra forma estarían protegidos frente a la digestión por PK. A la hora de clasificar las cepas de priones basándose en el patrón bioquímico tras la digestión con PK se pueden distinguir claramente dos grupos de cepas:

1. Cepas con un patrón "clásico", conformado por tres bandas de PrP^{Sc} (no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada), donde el tamaño de las bandas varía según la cepa de prión.
2. Cepas que muestran un patrón atípico, en el que, además de las tres bandas que no están bien definidas, se observan fragmentos más pequeños con un peso molecular que va entre los 6 y 8 KDa según la cepa del prión a estudiar. Entre las cepas de prión atípicas que afectan a humanos podemos encontrar distintas cepas causantes de la enfermedad de GSS (Parchi, Chen et al. 1998, Piccardo, Liepnieks et al. 2001, Tagliavini, Lievens et al. 2001, Alzualde, Indakoetxea et al. 2010), la cepa de la prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (Gambetti, Dong et al. 2008, Zou, Puoti et al. 2010) y la cepa Nor 98 de *scrapie* atípico que afecta a pequeños rumiantes (Pirisinu, Nonno et al. 2013).

Todas las cepas de priones muestran un tropismo específico y diferente hacia distintos órganos. Algunos de ellos se propagan preferente o exclusivamente en el sistema nervioso central, como es el caso del prión bovino que causa una EEB mientras que otros se detectan también en los órganos linfoides secundarios, como las cepas de *scrapie* y *ECJv* (Aguzzi and Calella 2009). Sin embargo, se desconocen los factores que determinan la diferencia en el tropismo celular en las distintas cepas de priones (Aguzzi and Calella 2009). En la actualidad se piensa que podría estar controlado o modulado por la existencia de cofactores celulares muy específicos tales como la existencia de proteínas chaperonas, receptores específicos de recaptación, distintos tipos de ARN, un entorno específico de lípidos, un entorno celular muy concreto o moléculas de PrP modificadas de una manera postrascriptional específica, entre otras (Aguzzi, Heikenwalder et al. 2007, Aguzzi and Calella 2009).

También se ha propuesto que, dado que el proceso de glicosilación varía entre los distintos tipos celulares, el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} podría actuar como un conductor de la PrP^{Sc} hacia una determinada zona del sistema nervioso central (SNC) (Collinge, Sidle et al. 1996).

Glicoformas concretas de PrP^{Sc} podrían replicarse de forma más favorable en aquellas poblaciones neuronales que expresen una glicoforma similar de PrP^C en su superficie celular (Collinge 2001).

BARRERA DE TRANSMISIÓN

Las investigaciones realizadas hasta hoy han identificado de forma inequívoca la existencia de una “barrera de transmisión” o resistencia a la transmisión, bien dentro de una misma especie con un polimorfismo diferente en el gen *PRNP* o bien entre especies distintas (Colby and Prusiner 2011). Esta “barrera de especies” se define como la dificultad que presentan algunas cepas de priones para transmitirse a una especie diferente a aquella de la que proceden (Dickinson 1976). Habitualmente se observa que, en un primer pase de propagación a animales de otra especie, no todos los individuos inoculados desarrollan la enfermedad, y los que la desarrollan lo hacen con periodos de incubación más prolongados y variables, comparados con lo que se observan en la transmisión de priones entre animales de la misma especie. De forma característica las cepas se van adaptando de forma que los tiempos de incubación se reducen conforme se hacen pases seriados en la nueva especie hospedadora hasta que finalmente se estabiliza la cepa (Collinge 2001).

Se ha observado que cada cepa de príon presenta propiedades propagativas específicas hacia otras especies dado que partiendo de dos cepas distintas que contienen la misma secuencia de aminoácidos, la transmisión puede variar (Collinge, Palmer et al. 1995, Hill, Desbruslais et al. 1997).

En la actualidad se piensa que la barrera de transmisión podría deberse a un efecto acumulativo de factores tales como la eficiencia de conversión y la patología generada por la cepa seleccionada (Kimberlin, Cole et al. 1987, Kimberlin, Walker et al. 1989). Sin embargo, parece ser que el factor más importante se relaciona con las diferencias aminoacídicas existentes entre la estructura primaria de PrP de la especie donante (inóculo), y la especie receptora

(hospedador) (Scott, Foster et al. 1989, Prusiner, Scott et al. 1990), siendo estas diferencias las que determinan el grado de transmisibilidad (Scott, Groth et al. 1993). Los estudios de transmisión realizados en humanos, han demostrado que los priones de la *ECJ* clásica, se pueden transmitir de manera eficiente en ratones transgénicos que expresan PrP^C humana, pero se encuentran con una barrera significativa en ratones con la forma endógena (*wild type, wt*). Por el contrario, en el caso de los priones *ECJv*, se ha visto que se transmiten fácilmente a ratones *wt*, mientras que su transmisión a ratones transgénicos que expresan PrP^C humana es relativamente ineficiente (Collinge 2001, Collinge and Clarke 2007).

ESTRUCTURA DE LA PrP^C Y LA PrP^{Sc}

La PrP^C humana es una glicoproteína que consta de 253 aminoácidos con secuencia altamente conservada en los mamíferos.

Durante el procesamiento de la proteína, el péptido señal que comprende desde los aminoácidos 1 al 22 es cortado y por medio de un anclaje de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) se localiza unida en la membrana celular por su extremo carboxilo terminal (C-Terminal). Además de esta forma de PrP^C se han descrito otras formas transmembranales que se localizan en zonas ricas en fosfolípidos (*lipids rafts*, regiones de la membrana enriquecida en colesterol y esfingolípidos) (Stewart and Harris 2003, Linden, Martins et al. 2008).

Las características estructurales de la PrP (**Figura 5**) son: La región amino terminal (N-terminal) de la PrP^C que consiste en los aminoácidos 23 a 124 en los humanos conforma un dominio flexible (Riek, Hornemann et al. 1997) y la región carboxilo terminal (C-terminal) que se localiza en el dominio globular. La región N-terminal se encuentra desestructurada y se compone de un segmento de cinco repeticiones (octarepeticiones) de una secuencia de 8 aminoácidos, conocida como la región de repetición del octapéptido que esta altamente conservada en todos los mamíferos. Flanqueando la zona de los OR hay 2 regiones cargadas positivamente (CC1 y CC2) conocidas como zonas de carga (del inglés, *Charged Cluster*), y entre todo este dominio

desestructurado y el dominio globular del extremo carboxilo terminal hay una región hidrofóbica conocida como núcleo hidrofóbico (del inglés, *Hydrophobic Core (HC)*).

El dominio globular de la PrP presenta un alto grado de conservación estructural, está organizado en tres hélices α y dos láminas β (Riek, Hornemann et al. 1996). Además incluyen la presencia de un puente disulfuro en Cys179 y Cys214 que interconecta las hélices H2 y H3 (**Figura 5**), así como una zona de glicosilación entre 2 Asparaginas (Asn-181 y Asn-197 en humanos) que son glicosiladas de forma variable, dando lugar a PrP^C no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada. La última característica de la PrP^C madura es su anclaje a membrana mediante un GPI (del inglés, *Glycosylphosphatidylinositol*), que es añadido en el extremo carboxilo terminal durante su maduración.

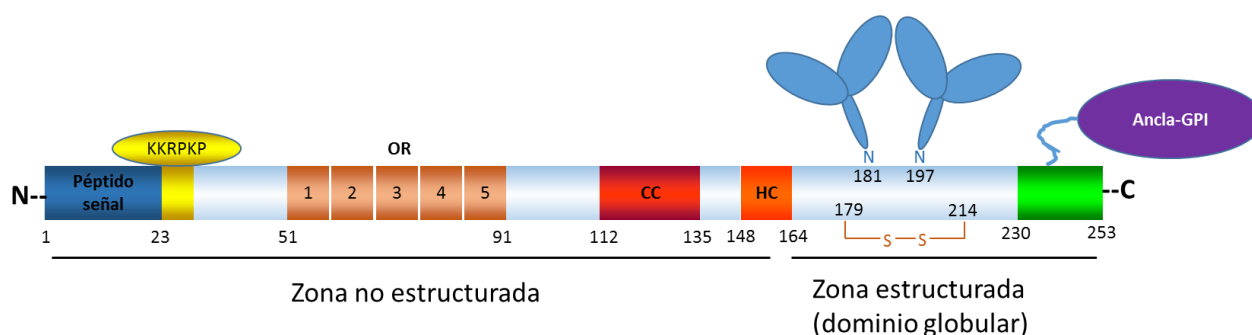


Figura 5. Estructura proteica primaria de la proteína priónica humana (PrP^C). A) Los números representan los diferentes aminoácidos. En azul se muestra la señal para que la proteína sea dirigida al retículo endoplasmático, en color carne se muestra los 5 repeticiones (octarepeticiones) [del inglés *octarepeats (OR)*], en rojo se dibuja zona de cargada (CC), en naranja se describe el núcleo hidrofóbico [del inglés *hidrophobic core (HC)*], en azul se representa la N-glicosilación de la proteína en los residuos 181 y 197, en morado se muestra el residuo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y representado como S-S el puente disulfuro entre los residuos 179 y 214 (Modificado de (Aguzzi and Heikenwalder 2006, Lewis and Hooper 2011)).

PrP^{Sc}

La estructura tridimensional de los oligómeros y polímeros de PrP^{Sc} es un campo de investigación intensiva y poco conocida. La resolución de la estructura de la PrP^{Sc} podría ser clave para comprender los mecanismos de replicación, así como los de neurotoxicidad o las bases

moleculares que definen la barrera de transmisión interespecies y la existencia de diferentes cepas.

Sin embargo, la resolución de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} es complicada debido a diversos obstáculos:

- 1) Dificultad en el estudio de la unidad básica de la PrP^{Sc} debido a su capacidad de formar polímeros de tamaño variado (Silveira, Raymond et al. 2005).
- 2) El alto peso molecular de los agregados de PrP^{Sc} y la concurrencia de diferentes grados de glicosilación de la proteína representan un importante obstáculo para las técnicas biofísicas clásicas como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear (RMN) (Diaz-Espinoza and Soto 2012).
- 3) La hidrofobicidad de los agregados de PrP^{Sc} que los hace insolubles en agua y formar agregados no cristalinos (en las condiciones habituales utilizadas en estudios estructurales). Además, los agregados no pueden solubilizarse con detergentes sin comprometer su infectividad (Gabizon, McKinley et al. 1987).
- 4) Dificultades en la purificación de la PrP^{Sc} de muestras de cerebro debido a su carácter viscoso y a la presencia de contaminantes que co-purifican con la PrP^{Sc} como otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Diringer, Beekes et al. 1997).

A pesar de estas limitaciones, diversas técnicas alternativas han sido utilizadas para obtener información sobre la estructura tridimensional de la PrP^{Sc}, entre las que se encuentran técnicas biofísicas como la resonancia paramagnética electrónica, la técnica de intercambio de hidrógeno-deuterio acoplada a la espectrometría de masas, RMN y otras técnicas de baja resolución (Dicroísmo circular y espectroscopía *FTIR*), técnicas de microscopía (microscopía electrónica y de fuerza atómica) y técnicas bioquímicas indirectas (proteólisis limitada y mapeo de epítomos mediante anticuerpos).

En cuanto a las técnicas biofísicas de baja resolución, como el dicroísmo circular y espectroscopía *FTIR*, han servido para obtener datos sobre la conformación de la proteína y generar varios modelos de la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} (Diaz-Espinoza and Soto 2012). A su vez, las técnicas microscópicas como la microscopía electrónica de transmisión (MET) (McKinley, Braunfeld et al. 1986) y más recientemente la microscopía de fuerza atómica (MFA) (Sim and Caughey 2009) han aportado detalles, sobre la ultraestructura de los agregados priónicos.

Por último, se han utilizado diversas técnicas bioquímicas como métodos indirectos para obtener información sobre la estructura de la PrP^{Sc}. En este sentido, la digestión de la PrP^{Sc} por la proteinasa K varía dependiendo de la cepa priónica utilizada, indicando que poseen diferentes conformaciones que permiten o dificultan el acceso de la enzima al sitio de corte (Cronier, Gros et al. 2008). También la proteólisis limitada ha aportado datos relevantes, ya que su resistencia parcial a la digestión proteolítica indica que el plegamiento y la agregación de cada cepa es ligeramente diferente (Cronier, Gros et al. 2008). El mapeo de epítomos accesibles con diferentes anticuerpos monoclonales es otro de los métodos que ha proyectado algo de luz sobre la estructura de la PrP^{Sc}.

Todos los datos obtenidos a partir de técnicas de baja resolución han dado lugar a diversos modelos estructurales propuestos durante las últimas décadas, siendo los modelos más relevantes el de hélice- β , el de espiral- β o el de hoja- β en registro cuyas representaciones pueden verse en la **figura 6**.

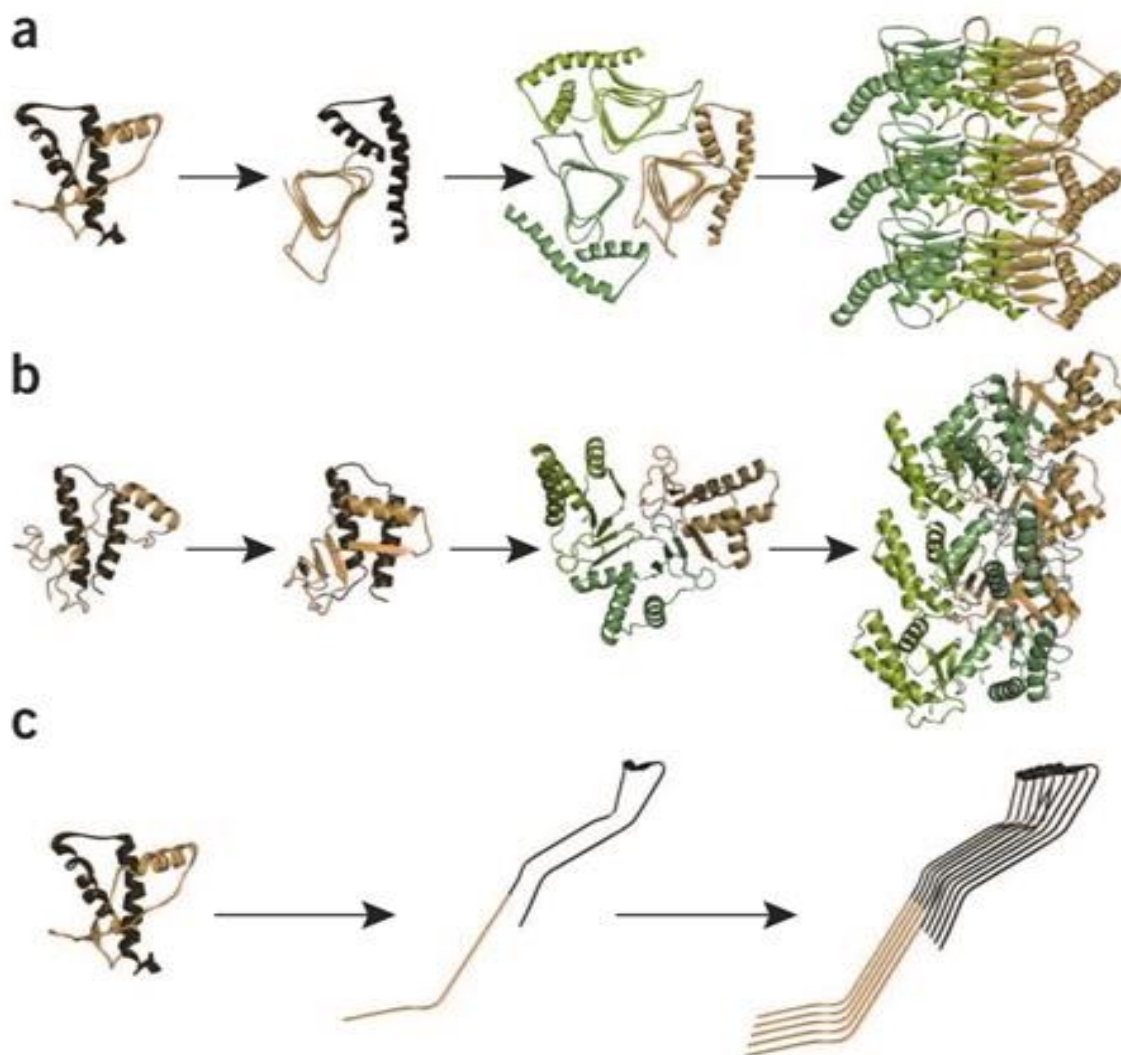


Figura 6. Representación gráfica de distintos modelos de estructura molecular de los agregados de PrP^{Sc}. A) Modelo β -helicoidal (hélices- β) en que la región N-terminal de la PrP^C sufre un gran cambio conformacional durante la conversión hacia un motivo conocido como hélice- β entre los residuos 90 y 177. La región C-terminal conserva en cambio la organización y estructura α -helicoidal propia de la PrP^C. B) Modelo conocido como espiral- β que consiste en un núcleo en espiral de laminas (hojas) extendidas formadas por hebras- β cortas que abarcan los residuos 116-119, 129-132, 135-140 y 160-164 y en el que las 3 hélices- α características de la PrP^C están altamente conservadas. C) Modelo de hoja- β paralela en registro que propone un desplegamiento y re-plegamiento completo de la PrP^C a una estructura compuesta mayoritariamente por hoja- β . Para facilitar la comparación se ha mantenido la asignación de colores a los distintos motivos estructurales en los 3 modelos (Modificado de Diaz-Espinoza and Soto 2012).

Queda patente que aún queda un largo camino que recorrer para llegar al conocimiento detallado de la estructura de la PrP^{Sc} y más aun teniendo en cuenta que, aunque la mayoría de PrP^{Sc} purificada aparece en forma de fibras amiloideas, se conocen priones altamente infecciosos que no adquieren estructuras fibrilares (Silveira, Raymond et al. 2005). Así que, a pesar de la importancia de resolver la estructura de agregados amiloideos de PrP^{Sc} altamente infecciosos, es

probable que conocer las estructuras de PrP^{Sc} no amiloideo o precursor de las fibras sea también de vital importancia (Kraus, Groveman et al. 2013).

TRÁFICO CELULAR DE LA PrP^C

Una vez que la PrP se ha sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso y ha pasado a través de los mecanismos de control de calidad de proteínas de la célula, PrP^C se transporta por el aparato de Golgi donde se une a las balsas lipídicas a través de su anclaje de GPI y es llevada a la superficie de la célula (Taraboulos, Raeber et al. 1992). Su retención en la superficie es de corta duración y la proteína se internaliza de nuevo en el citosol, donde es reciclada o degradada por los lisosomas (Taraboulos, Raeber et al. 1992). Además, la internalización y el tráfico de la PrP^C parecen estar mediados por los endosomas y lisosomas revestidos de clatrina y/o caveolin mediada por mecanismos de endocitosis (Harris, Huber et al. 1993, Shyng, Huber et al. 1993, Shyng, Heuser et al. 1994, Vey, Pilkuhn et al. 1996) (**Figura 7**). Alternativamente, el plegamiento incorrecto de PrP^C desencadena los mecanismos de control de calidad de proteínas que finalmente dirigirán a la proteína a su degradación a través del sistema ubiquitina-proteasoma (del inglés *ubiquitin- proteasome system, UPS*) (Ma and Lindquist 2001).

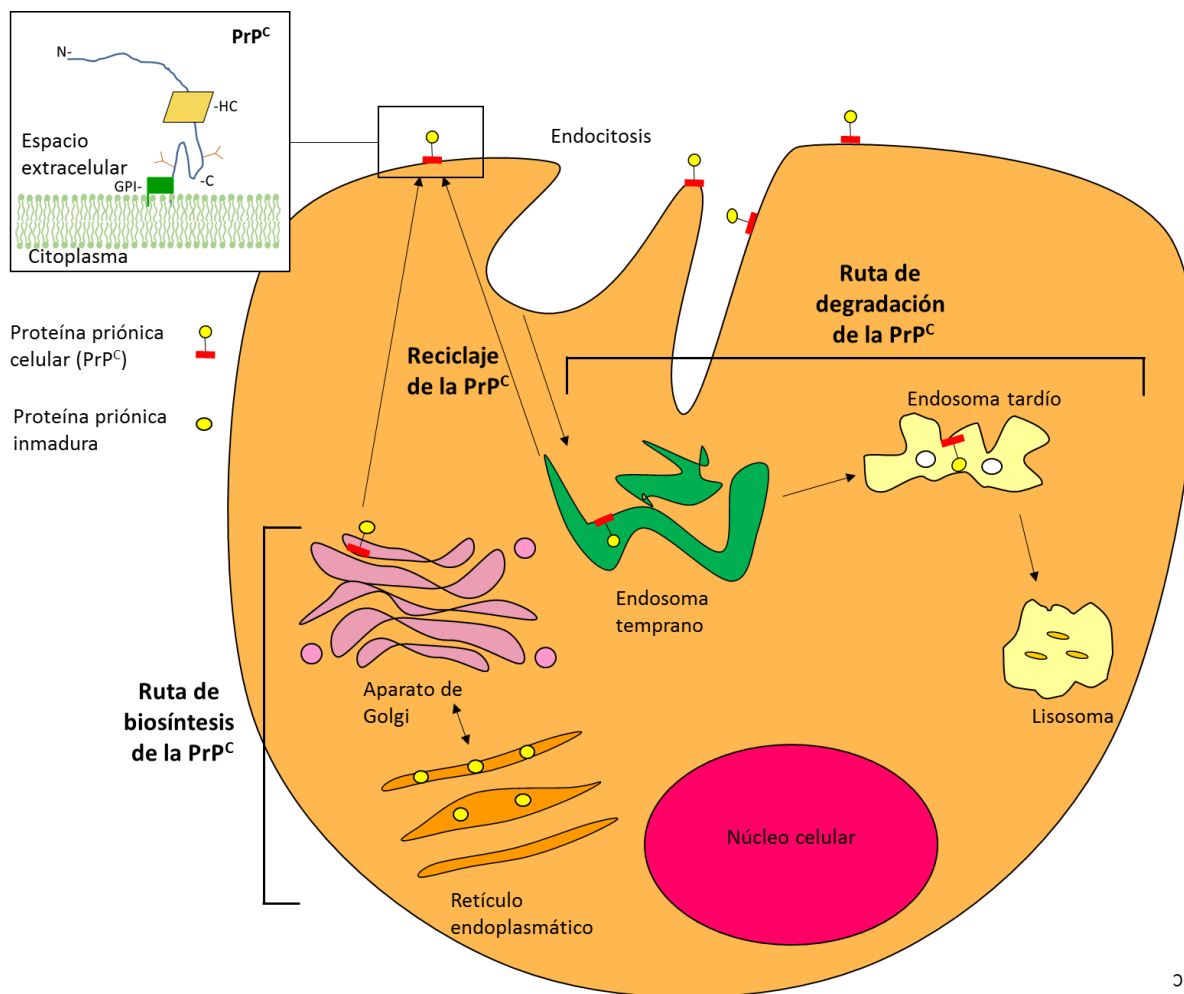


Figura 7. Ciclo celular de la proteína priónica celular (PrP^C). La proteína priónica celular es una proteína que se sintetiza en el retículo endoplasmático y que es transportada al aparato de Golgi donde adquiere una serie de modificaciones post-traduccionales: eliminación del péptido señal, adición de cadenas de oligosacáridos, la formación de un puente disulfuro y la adición de un péptido de anclaje a la membrana (GPI). Una vez formada la proteína madura viaja hasta la membrana plasmática para desempeñar su función. Una vez en la membrana es endocitada por los endosomas tempranos para luego ser degradada en los lisosomas o reciclada y devuelta a la membrana plasmática (Modificado de (Brown 2001, Rajendran, Udayar et al. 2012).

ENFERMEDADES ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN HUMANOS

Las EETs humanas (EETH) al estar asociadas con una gran variedad de presentaciones clínicas han tenido que ser clasificadas teniendo en cuenta el huésped, su etiología y la clínica que presentan. Por ello, estas enfermedades pueden aparecer de forma esporádica (supuestamente espontánea) o presentar un origen genético o iatrogénico (Collinge 2005, Imran and Mahmood 2011).

Clasificación de las enfermedades espongiiformes transmisibles humanas

- **Enfermedades priónicas humanas esporádicas:** Este grupo de enfermedades parecen ocurrir de forma espontánea, desconociéndose aún la causa desencadenante. Entre estas enfermedades esporádicas podemos encontrar la *ECJe* y la prionopatía con sensibilidad variable a proteasas.
- **Enfermedades priónicas humanas iatrogénicas:** Este grupo de enfermedades han surgido como consecuencia de una exposición accidental a priones humanos a través de procedimientos médicos o quirúrgicos o a través de la participación en prácticas caníbales. Entre estas enfermedades podemos encontrar a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (*ECJi*), el kuru y la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (*ECJv*).
- **Enfermedades priónicas humanas genéticas:** Este grupo de enfermedades también son conocidas como familiares o hereditarias (*EETg*) y constituyen aproximadamente el 15% de todas las EETs. Hasta la fecha, han sido descritas más de 40 mutaciones diversas relacionadas con estas enfermedades, pudiendo ser desde mutaciones puntuales a mutaciones de inserción o deleción en las repeticiones de octapéptidos (Colby and Prusiner 2011) en el gen *PRNP*. Las enfermedades clasificadas en este grupo corresponden a la enfermedad de Creutzfeldt- Jakob genética o hereditaria (*ECJg*), IFF y GSS. (Figura 8).

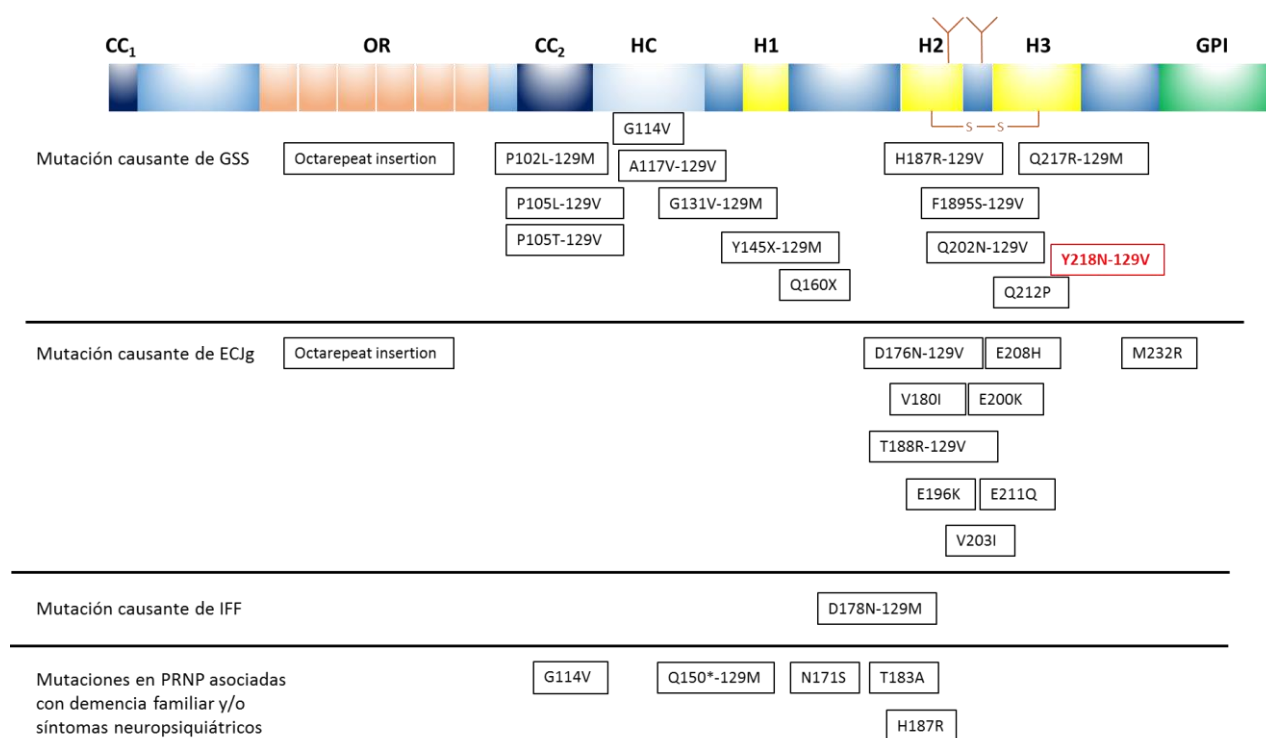


Figura 8. Mutaciones puntuales relacionadas con las enfermedades priónicas de tipo genético en la proteína priónica humana. La PrP^C humana madura contiene 208 aminoácidos. Contiene dos grupos de aminoácidos cargados positivamente (CC₁ y CC₂), una región de repetición de un octapéptido (OR), un núcleo hidrofóbico (HC), tres hélices- α (H1-H3), un puente disulfuro (S-S) entre los residuos de cisteína 179 y 214 y dos sitios para formar N-glicosilaciones (horquillas rojas). Posteriormente, se inserta un grupo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) al extremo C-terminal (Modificado de (Aguzzi, Baumann et al. 2008, Capellari, Strammiello et al. 2011).

Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinken (GSS):

La GSS es una enfermedad priónica poco conocida, de origen hereditario. Presenta una incidencia de 1 por cada 100 millones de habitantes por año (Belay 1999). Este síndrome fue descrito por primera vez en 1936 en una familia austriaca, en la que los miembros manifestaron una ataxia cerebelosa de curso lento y progresivo junto con deterioro cognitivo (Comentado por Liberski 2012). Está asociada principalmente a mutaciones puntuales en la secuencia del gen *PRNP*, frecuentemente a un cambio en el codón 102 de Prolina a Leucina. La gran variabilidad de mutaciones descritas se corresponde con la diversidad de síntomas clínicos, edad de inicio y duración de la enfermedad (Piccardo, Dlouhy et al. 1998, Mastrianni 2010). Entre las mutaciones involucradas en el desarrollo del síndrome GSS se encuentran las siguientes: P102L-129M; P105L-

129V; A117V-129V; Y145STOP-129M; F198S-129V; D202N-129V; Q212P; y Q217R-129V (Belay 1999, Kovacs, Puopolo et al. 2005) y Y218N (Alzualde, Indakoetxea et al. 2010). En muchas de ellas es determinante el polimorfismo M/V en la posición 129 para la aparición de la enfermedad.

Son características de la GSS la aparición a edad temprana (30-40 años) y la progresión lenta durante un período promedio de 5 años (Liberski 2012). Los síntomas clínicos incluyen ataxia cerebelosa, alteraciones de la marcha, demencia, disartria, dismetría ocular, mioclonías infrecuente, signos parkinsonianos e hiporreflexia o arreflexia en las extremidades inferiores (Belay 1999, Liberski and Budka 2004, Liberski 2012).

La mutación Y218N parece presentar algunos aspectos característicos, tales como la alteración cognitiva sin ataxia (presente también en los individuos con la mutación pero sin síntomas piramidales), el parkinsonismo o la epilepsia. La alteración del lenguaje y la disfunción cognitiva también podrían ser síntomas prematuros. Estos pacientes junto con aquellos que portan las mutaciones F198S y Q217R presentan una hiperfosforilación de Tau en el análisis neuropatológico (Alzualde, Indakoetxea et al. 2010).

Entre las lesiones histopatológicas observadas en los encéfalos de pacientes afectados se observan numerosos depósitos o placas amiloides de PrP^{Sc} con mínimos cambios espongiiformes junto con pérdida neuronal, microgliosis, astrogliosis y ovillos neurofibrilares (Belay 1999). Los pacientes con GSS muestran características placas amiloides multicéntricas (Kovacs and Budka 2009).

Insomnio familiar fatal (IFF):

El IFF fue descrito en 1939 como una enfermedad que provoca demencia progresiva y degeneración simétrica bilateral del tálamo. Inicialmente conocida como demencia talámica, es una enfermedad hereditaria y la mayoría de los casos estudiados presentan una mutación en el codón 178 del *PRNP* que induce la generación de PrP^{Sc} (Medori, Tritschler et al. 1992) y que está ligada a los polimorfismos del codón 129MV. La duración de la enfermedad puede ser

significativamente más corta en individuos 129MM (Medori, Tritschler et al. 1992, Mastrianni 2010, Cortez and Sim 2013). Presenta una incidencia igual en hombres y mujeres. La aparición de IFF ocurre a la edad entre 20 y 72 años, con una edad media de 49 años y se alarga durante un promedio de 18 meses.

La sintomatología clínica presente en los pacientes incluye insomnio y sueño interrumpido, pero también se pueden observar otros signos como mioclonía, ataxia, disartria, disfagia, signos piramidales e hiperactividad autonómica (Belay 1999, Montagna, Gambetti et al. 2003). La gravedad y la secuencia de aparición de los síntomas clínicos pueden variar entre los genotipos 129MM y 129MV. De este modo, los síntomas de insomnio, mioclonías y disfunción autonómica suelen ser más graves en individuos 129MM, mientras que los síntomas de ataxia y disartria predominan en los individuos 129MV (Belay 1999, Montagna, Gambetti et al. 2003, Capellari, Strammiello et al. 2011).

Kuru

El Kuru cursa con ataxia cerebelosa progresiva y con deterioro cognitivo en estadios avanzados de la enfermedad. Su característica neuropatológica típica es la aparición de placas extracelulares de PrP^{Sc} llamadas “placas floridas” por su aspecto al microscopio. La enfermedad de Kuru fue reportada por primera vez en 1957 (Gajdusek and Zigas 1957) y fue reconocida como endémica entre los residentes de la tribu Fore en las montañas del este de Nueva Guinea, aunque también se observó en las tribus vecinas (Gajdusek and Zigas 1957, Gajdusek 1977) las cuales practicaban el ritual de endocanibalismo. Ese ritual consistía en comer los restos de personas muertas y de cubrirse el cuerpo con ellos, por lo que el contagio se producía tanto por vía digestiva como por inoculación cutánea. El hecho de que las mujeres del grupo fueran las principales protagonistas de estos rituales explica que el ratio de la enfermedad entre mujeres y hombres fuera de diez a uno a favor de ellas (Hornabrook 1968). La supresión de ese tipo de

rituales entre los individuos de esa población ha supuesto la casi completa erradicación de la enfermedad (Huillard d'Aignaux, Cousens et al. 2002). La sintomatología clínica se caracteriza por ataxia cerebelosa con la cognición relativamente preservada hasta estadios tardío, precedida de dolores de cabeza, dolores en las articulaciones y temblor de las extremidades. Los últimos casos reportados, la mayoría ligados al polimorfismo M129V, aparecieron más de 40 años después del cese del canibalismo, lo que sugiere un periodo de incubación muy largo (Collinge, Whitfield et al. 2006). Cabe destacar que un factor resistente al Kuru ha sido reportado en las personas que sobrevivieron a la epidemia en Papúa Nueva Guinea ya que aquellos individuos portadores de la variante genética G127V mostraron una predisposición menor a la enfermedad (Mead, Whitfield et al. 2009).

Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)

A pesar de ser la prionopatía más común en humanos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es rara, afectando anualmente a 1-2 individuos por cada millón de la población mundial, independientemente del sexo. La *ECJ* se puede presentar bajo tres formas diferentes en relación con su etiología: esporádica, genética (hereditaria) o iatrogénica (Prusiner 1998, Ironside, Head et al. 2002).

ECJ esporádica (ECJe)

La enfermedad esporádica de Creutzfeldt-Jakob (*ECJe*) es con diferencia la prionopatía más común, representando aproximadamente el 85% de las enfermedades priónicas humanas. Se ha reportado en todo el mundo con una distribución aleatoria y una incidencia anual de 1 a 2 casos por millón de habitantes (Mead, Stumpf et al. 2003), con la misma incidencia entre hombres y mujeres, con picos de edad en muy jóvenes (11 años) y seniles (más de 90 años). Hoy en día se desconocen las causas que desencadenan el desarrollo de esta enfermedad, aunque se han sugerido el efecto ambiental o sucesos aleatorios endógenos aún desconocidos como por ejemplo una mutación somática en el gen *PRNP* o una conversión espontánea de PrP^C en PrP^{Sc}

(Brown, Cathala et al. 1987, Ironside 1996). La genética de cada individuo parece ser un factor importante en el desarrollo de la *ECJe*. La mayoría de la población caucásica presenta heterocigosis MV en el codón 129 (Alperovitch, Zerr et al. 1999, Parchi, Giese et al. 1999), mientras que existe una cierta predominancia de homocigotos para metionina (MM) en los enfermos (Goldfarb, Brown et al. 1994, Prusiner 1998). La enfermedad avanza rápidamente y los pacientes mueren en un periodo de tiempo que oscila entre los 4 a 6 meses tras la aparición de los primeros síntomas clínicos (Brown, Cathala et al. 1987, Alperovitch, Zerr et al. 1999, Knight and Will 2004). Durante el curso de la enfermedad, se pueden observar síntomas como disfunción piramidal y extrapiramidal, temblores, espasticidad y rigidez, cambios en el comportamiento como agitación, confusión y depresión. Al final del curso de la enfermedad dejan de responder a cualquier estímulo externo (Belay 1999). Esta enfermedad se distingue por la presencia de cambios espongiiformes en el estudio neuropatológico y por una distribución dispersa de la PrP^{Sc} en el SNC, observándose en un 10-15% de los casos depósitos de placas amiloides. Los distintos síntomas clínicos pueden ser atribuidos a diferentes cepas de priones. Hasta el momento se han identificado seis subtipos de *ECJe* con distintivos rasgos clínico-patológicos, tipos de PrP^{Sc} y polimorfismo del codón 129 en el gen *PRNP* (Parchi, Castellani et al. 1996, Parchi, Giese et al. 1999).

Subtipo 1 (MM1 y MV1): Este subtipo se observa en pacientes que son homocigotos a metionina (MM) o heterocigotos (MV) y presentan una PrP^{Sc} de tipo 1. La duración clínica va de 3 a 4 meses (Gambetti, Kong et al. 2003), comúnmente se observa una pérdida cognitiva y signos visuales de ceguera cortical (Síndrome de Heidenhain's).

Subtipo 2 (VV2): En general las personas afectadas presentan una edad de 60 años y la duración de los signos clínicos es de unos 6 meses, con un rango entre los 3 y 18 meses, representa cerca del 16% de todos los casos (Gambetti, Kong et al. 2003). Las características neuropatológicas varían dependiendo de la zonas del cerebro comprometidas; observándose

rasgos distintivos de inmunoreactividad en cerebelo y células de Purkinje (Sikorska, Knight et al. 2012).

Subtipo 3 (MV2): Este subtipo es conocido como síndrome de Beti Brownell/Oppenheimer, se observa en el 9-10% de los casos. Tiene una duración aproximada de 17 meses, y una presentación clínica y neuropatológica similar al subtipo VV2 (Sikorska, Knight et al. 2012).

Subtipo 4 (MM2): Se presenta en personas con un promedio de edad de 65 años, representa un 2-8% de los casos, la enfermedad tiene una duración media de 16 meses. Los síntomas más frecuentemente observados en este subtipo son la afasia y el deterioro cognitivo. Las características neuropatológicas muestran vacuolas más grandes que las observadas en el subtipo 1 y se localizan principalmente en la corteza cerebral, ganglios basales y tálamo. La inmunohistoquímica muestra depósitos alrededor de las vacuolas, mientras que la formación de placas es inexistente (Sikorska, Knight et al. 2012).

Subtipo 5 (VV1): Se conoce como *ECJ* de inicio temprano. Es el menos frecuente de los subtipos, afecta al 1% de los casos. El rango de edad de presentación de los síntomas oscila entre los 24 y los 49 años y la duración de la enfermedad aproximada es de 15 meses. Se caracteriza por afectar la corteza del hipocampo, en especial el tálamo y el cerebelo (Parchi, Chen et al. 1998, Gambetti, Kong et al. 2003).

Subtipo 6 (insomnio fatal esporádico): Este subtipo también es infrecuente detectándose en el 2% de todos los casos de las enfermedades priónicas de tipo esporádico. El fenotipo es prácticamente idéntico al insomnio familiar fatal (IFF), por lo que se le ha dado el nombre de insomnio fatal esporádico. Las zonas más afectadas son el tálamo, los núcleos que forman parte del sistema límbico, el núcleo medial dorsal y el núcleo ventral anterior (Mastrianni, Nixon et al. 1999, Parchi, Capellari et al. 1999, Sikorska, Knight et al. 2012).

***ECJ* genética (*ECJg*)**

Es una enfermedad priónica de origen genético, con una incidencia del 10 al 15%. Diferentes mutaciones en el gen *PRNP* humano se han vinculado a esta forma de la enfermedad. La aparición de la enfermedad ocurre entre los 30 y 35 años presentando una progresión que va desde unos meses hasta varios años.

En la patogénesis de la enfermedad podrían estar involucradas múltiples cepas, aunque por el momento no están identificadas. Como anteriormente se mencionó, las mutaciones en el gen *PRNP* puede desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad utilizando distintos mecanismos: i) aumento en la propensión a la agregación de la PrP^C, ii) aumento de la retención de moléculas de PrP agregadas dentro de las vías de secreción y iii) modulación de puentes intramoleculares y de interacciones de enlaces de hidrógeno. La causa más frecuente de *ECJg* es la mutación E200K (sustitución de ácido glutámico por lisina en el codón 200) (Pinel, Montero et al. 2011). Esta mutación aparece en más del 70% de los casos de familias con *ECJ* hereditaria en todo el mundo. Otras mutaciones responsables del desarrollo de *ECJg* son G114V, R148H, T183A, T188A, T188K, T188R, E196K, E200G, V203I, R208H, V210I, E211Q, M232R Y P238S, siendo las mutaciones más recurrentes la E200K, V210I, D178N y V180I. La clínica que se desarrolla en casi todos los casos coincide con la *ECJ* de tipo esporádica (Gambetti, Parchi et al. 2003), *ECJ* iatrogénico y variante.

***ECJ* iatrogénico y variante**

Creutzfeldt-Jacob iatrogénico (ECJi)

Las formas iatrogénicas de la *ECJ* corresponden a menos del 5% de las EETs humanas. La *ECJi* fue descrita por primera vez en el año 1974 en un paciente al que se le realizó un trasplante de córnea infectado con *ECJ* (Duffy, Wolf et al. 1974). Posteriormente en 1985, fueron reportados casos de *ECJ* en adultos jóvenes que habían recibido hormona de crecimiento humano o gonadotropina derivada de donantes infectados, 10 a 15 años antes de haber desarrollado la

enfermedad (Gardner 2007, Sikorska, Knight et al. 2012). Los casos iatrogénicos resultantes del uso de la hormona de crecimiento están asociados con el genotipo homocigoto VV en el codón 129. (Pinel, Montero et al. 2011). Así mismo se han reportado casos de personas que habían recibido injertos de duramadre de cadáveres humanos con enfermedad no detectada o de pacientes que habían tenido procedimientos quirúrgicos invasivos, durante los que instrumentos no desechables entran en contacto con tejidos que actúan como vías de entrada para la transmisión de la enfermedad (Rabano, de Pedro-Cuesta et al. 2005) dado que los instrumentos pueden retener un considerable nivel de infectividad tras la esterilización de rutina. Las características clínico-patológicas se asemejan a las de *ECJe* (Belay 1999, Will 2003).

Las formas de origen hereditario, esporádico o iatrogénico suelen presentarse en personas de entre 55 y 75 años, y cursan con un rápido deterioro cognitivo, con diferentes grados de disfunción cerebelar, mioclonía y alteraciones en la capacidad visual y el habla, llevando a la muerte del afectado varias semanas después de la aparición del primer signo clínico (Gambetti, Kong et al. 2003, Sikorska, Knight et al. 2012).

Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJv)

Una nueva forma de enfermedad priónica humana, la variante denominada *ECJ (ECJv)*, apareció en el Reino Unido aproximadamente 10 años después del estallido de la epidemia de EEB. Los primeros pacientes se observaron en Gran Bretaña en 1994. En contraste con *ECJe* que se produce por lo general a una edad tardía, los pacientes que desarrollaban la *ECJv* en promedio presentan sintomatología clínica a los 28 años de edad con progresión relativamente lenta. Notablemente presentan síntomas psiquiátricos y conductuales. Todos los casos descritos de la *ECJv* confirmados, probables y posibles se observaron en individuos MM para el gen *PRNP* en el codón 129. La neuropatología en estos casos consiste fundamentalmente en atrofia de la región cortical del cerebro y cerebelo (Ironsides, Head et al. 2002).

La aparición de la *ECJv* se atribuye al consumo de productos cárnicos infectados con EEB. Aunque el origen de la EEB en el ganado no ha sido absolutamente demostrado, dada la ocurrencia geográfica restringida y la cronología de la EEB y *ECJv*; así como, la evidencia experimental en cuanto a la similitud de los agentes causales, se considera que la EEB fue el origen de la *ECJv* humano (Prusiner 1998). La transmisión experimental de la EEB por la sangre en primates se publicó en 2002 (Bons, Lehmann et al. 2002, Zou, Fang et al. 2008).

Prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (vPSP_r):

Esta prionopatía se considera una nueva forma de demencia atípica que fue descrita por primera vez en el año 2008 en 11 pacientes, todos ellos homocigotos en el codón 129 VV. Además, la mayoría de ellos refería una historia familiar de deterioro cognitivo.

Se caracteriza por que la PrP^{Sc} presenta una resistencia a PK disminuida es decir mayor sensibilidad a ser digerida. Aunque al principio se describió sólo en los casos que presentaban homocigosis para valina en el codón 129 (Gambetti, Dong et al. 2008), posteriormente se han descrito formas en individuos con los tres genotipos (129 MM, 129 MV, 129 VV) (Giaccone, Di Fede et al. 2007, Head, Lowrie et al. 2010, Rodriguez-Martinez, Garrido et al. 2010). El análisis de *WB* de homogeneizados de cerebro después del tratamiento con PK muestra las bandas típicas más una banda de 8 kDa, similar a las detectadas en GSS.

La PrP^{Sc} del genotipo 129 VV es más sensible que la del genotipo 129 MM, mientras que la PrP^{Sc} del genotipo 129MV muestra una sensibilidad intermedia (Zou, Puoti et al. 2010). Hasta el momento han sido reportados alrededor de 30 casos en todo el mundo siendo la mayoría, portadores de un genotipo 129 VV. Hasta el momento se sabe muy poco acerca de los mecanismos implicados en esta enfermedad, la epidemiología, la transmisión y las características moleculares de vPSP_r (Head, Yull et al. 2013).

POSIBLES FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA PrP^C

Pese a los múltiples esfuerzos para dilucidar el rol fisiológico de la PrP^C, aún no se ha determinado la función exacta de la PrP celular. La PrP^C al ser expresada ampliamente en el SNC de los mamíferos y contar con una secuencia altamente conservada a través de diferentes especies, hace pensar que juega un importante rol funcional en el organismo. Se ha discutido la implicación de la proteína en varias funciones entre las que destacan la proliferación y diferenciación de células, la regulación de la homeostasis celular, o la formación y función de las sinapsis (revisado por (Choi, Kanthasamy et al. 2006, Linden, Martins et al. 2008). A continuación, se describen algunas de las posibles funciones de esta proteína celular (**Figura 9**).



Figura 9. Posibles funciones fisiológicas de la PrP^C

PrP^C y la regulación del ciclo celular y la proliferación.

A nivel clínico, numerosos estudios han demostrado una clara correlación entre la desregulación de la maquinaria del ciclo celular y el desarrollo de enfermedades que afectan al sistema nervioso como la enfermedad de Alzheimer (Vincent, Jicha et al. 1997) (Vincent *et al.*, 1997), el Parkinson o la isquemia entre otros (Wang, Yang et al. 2007) (Wang *et al.*, 2009).

El estudio de la expresión de PrP^C durante el desarrollo o embriogénesis ha sido de especial importancia a la hora de asignar a PrP^C un papel en procesos de proliferación celular (McKinley, Hay et al. 1987, Manson, West et al. 1992, Miele, Alejo Blanco et al. 2003). Además, PrP^C también parece ejercer este rol en poblaciones celulares en constante renovación (células madre del adulto) presentes en zonas proliferativas del cerebro adulto del hipocampo como la zona subventricular (del inglés *subventricular zone*, SVZ) y el giro dentado. Ensayos de sobreexpresión y silenciamiento realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado cambios proliferativos en las células madre neuronales asociados a PrP^C. Parece ser que los niveles de la proteína en la membrana confieren una mayor o menor respuesta a factores de crecimiento según el tipo celular y el estadio de desarrollo, favoreciendo así su proliferación o su diferenciación (Steele, Emsley et al. 2006, Lee and Baskakov 2010). En concordancia con estos datos, el análisis de expresión génica de modelos *in vivo* e *in vitro* KO para *PRNP* han revelado cambios de expresión de genes asociados tanto a ciclo celular como a mecanismos de señalización por factores de crecimiento (Satoh, Kuroda et al. 2000, Liang, Pan et al. 2007). Estas alteraciones en la expresión génica derivada de la presencia/ausencia de PrP^C sugieren que su función pueda contribuir al control de la proliferación en determinados tipos celulares.

PrP^C en la neuritogénesis

Ensayos de sobreexpresión (Pantera, Bini et al. 2009, Watanabe, Yasutaka et al. 2012) o silenciamiento de PrP^C (Loubet, Dakowski et al. 2012); así como, estudios en modelos animales y estudios *in vitro* (Graner, Mercadante et al. 2000, Schmitt-Ulms, Legname et al. 2001, Santuccione, Sytnyk et al. 2005, Steele, Emsley et al. 2006, Bribian, Fontana et al. 2012, Alleaume-Butaux A 2013) han permitido describir el rol de la proteína priónica en la neuritogénesis.

En modelos animales se ha visto que la proteína priónica se expresa en precursores tanto neuronales (Kim, Choi et al. 2005, Steele, Emsley et al. 2006) como gliales (Bribian, Fontana et al.

2012) y parece actuar favoreciendo la diferenciación celular. No obstante, PrP^C parece tener el efecto opuesto sobre las células indiferenciadas en el adulto (Steele, Emsley et al. 2006). En otro estudio hecho en ratones *PRNP-KO*, se concluyó que la falta de PrP^C producía alteraciones funcionales en aquellas estructuras cerebrales en las que PrP^C se expresa de forma preferente, como es el hipocampo y otras estructuras del sistema límbico. De ahí que la PrP^C se haya asociado a procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria a corto y largo plazo (Criado, Sanchez-Alavez et al. 2005) o al mantenimiento de los ritmos circadianos y el patrón del sueño (Tobler, Gaus et al. 1996, Tobler, Deboer et al. 1997, Huber, Deboer et al. 1999).

En paralelo a estos estudios, se han identificado ligandos de interacción con PrP^C, como la laminina, el precursor del receptor de la laminina (Graner, Mercadante et al. 2000) y la molécula de adhesión neural NCAM (Schmitt-Ulms, Legname et al. 2001, Santuccione, Sytnyk et al. 2005). Estos ligandos están implicados en mecanismos de neuritogénesis, por lo que su interacción con la proteína priónica puede ser importante para la estabilidad sináptica y el desarrollo y plasticidad neuronal (Graner, Mercadante et al. 2000, Santuccione, Sytnyk et al. 2005). Asimismo, algunos estudios también han sugerido un papel de PrP^C en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales (AF) durante la diferenciación neuronal. Las AF son complejos proteicos de membrana a través de los cuales el citoesqueleto de una célula conecta con la matriz extracelular. Parece ser que PrP^C está presente en estas estructuras de membrana en asociación a las proteínas reggie/flotilina (Schrock, Solis et al. 2009, Alleaume-Butaux A 2013).

PrP^C en la sinapsis

Existe evidencia que sugiere que la PrP^C puede estar jugando un papel importante en las sinapsis neuronales mediante la regulación de los receptores de glutamato y, consecuentemente, en la regulación de la excitabilidad neuronal. Los principales argumentos a favor de esta hipótesis se resumen a continuación:

1. Una de las principales características neuropatológicas de las enfermedades priónicas es la degeneración sináptica (Clinton, Forsyth et al. 1993).

2. PrP^C se ve localizada en la sinapsis neuronal, formando parte de complejos de señalización junto a receptores y canales iónicos de las membranas pre y post-sinápticas (Fournier, Escaig-Haye et al. 1995, Fournier, Escaig-Haye et al. 2000, Moya, Sales et al. 2000, Fournier 2008).

3. PrP^C es capaz de ligar cobre a través de la región de repeticiones de un octapéptido, por lo que posiblemente participa en el mantenimiento del estado de oxidación-reducción y en la homeostasis del Ca²⁺ en el terminal sináptico (Vassallo and Herms 2003).

4. PrP^C participa en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis mediante su interacción con proteínas como la sinaptofisina o la sinapsina (Keshet, Bar-Peled et al. 2000, Spielhaupter and Schatzl 2001).

5. PrP^C es capaz de modular la actividad de diferentes tipos de receptores de glutamato (subunidades de receptores AMPA/KA (Rangel, Burgaya et al. 2007), subunidad NR2D (Khosravani et al., 2008) y receptores metabotrópicos mGluR1/5 (Beraldo, Arantes et al. 2011).

Todos estos indicios, la mayoría descritos a partir de estudios *KO in vivo* e *in vitro*, sugieren un papel importante de la proteína priónica celular en el mantenimiento de la función sináptica (Collinge, Whittington et al. 1994, Brown 2001). No hay que olvidar, que muchas de las otras funciones asociadas a PrP^C, están íntimamente asociadas al rol sináptico de la proteína. Esto es debido a que PrP^C, desde su ubicación en membrana, concretamente en las balsas lipídicas (Taylor and Hooper 2006, Lewis and Hooper 2011), actúa como una proteína transductora de señales intracelulares a través de la modulación de vías principales de señalización (Hugel, Martinez et al. 2004, Linden, Martins et al. 2008). Las quinasas reguladas por PrP^C actúan a su vez sobre múltiples dianas implicadas en gran diversidad de procesos celulares, algunos de ellos

esenciales durante el proceso de neuritogénesis y posterior formación y mantenimiento de los circuitos neuronales.

PrP^C y su función neuroprotectora

Una de las principales evidencias del rol neuroprotector de PrP^C se ha encontrado en estudios hechos en ratones *PRNP-KO*, que debido a la carencia de la PrP^C presenta una susceptibilidad incrementada a estrés oxidativo (Bons, Lehmann et al. 2002), así como a fenómenos de excitotoxicidad inducida por agonistas de glutamato (Walz, Amaral et al. 1999, Rangel, Burgaya et al. 2007) o NMDA (Khosravani, Zhang et al. 2008).

Se cree que la PrP^C juega un papel importante en la supervivencia celular debido a que interacciona con otras moléculas muy importantes para la homeostasis celular, tal es el caso de su función antiapoptótica, suprimiendo la muerte celular mediada por Bax (Proteína X asociada a Bcl-2) (Bounhar, Zhang et al. 2001) o su papel indispensable en la activación de la quinasa Fyn, la cual está asociada con mecanismos de supervivencia celular y proliferación (Mouillet-Richard, Ermonval et al. 2000).

El papel neuroprotector de PrP^C sugiere que la disminución de sus niveles endógenos observados en las prionopatías produce una disminución de la neuroprotección dependiente de PrP^C en el organismo.

EXPRESIÓN TISULAR Y CELULAR DE PRP^C

Se conoce que la PrP^C se expresa en varios tejidos y órganos del cuerpo entre los que encontramos componentes celulares del sistema inmune, la sangre, el estómago, el corazón o incluso el riñón. Sin embargo, su presencia predominantemente corresponde al SNC, donde se ubica de forma más pronunciada en regiones tales como el cerebelo y bulbo olfatorio (Sales, Rodolfo et al. 1998). A nivel celular, se expresa en múltiples poblaciones neuronales del

hipocampo, el tálamo y el neocórtex; así como, en células gliales. En la microglía y los astrocitos el nivel de expresión de la PrP^C es considerablemente menor, ya que sólo expresan una única forma (doble glicosilada) mientras que las neuronas expresan las tres formas típicas de glicosilación (Brown, Schmidt et al. 1998).

En las neuronas la PrP^C predomina en los compartimentos endocíticos, los axones, las dendritas y especialmente en el botón sináptico. Su localización exacta en la sinapsis ha creado cierta controversia; algunos estudios (Benvegnu, Poggiolini et al. 2010) han descrito una presencia pre-sináptica, post-sináptica o ambas (Bailly, Haeberle et al. 2004, Fournier 2008). En cualquier caso, su presencia en la sinapsis sugiere un posible rol en el control de la transmisión del impulso nervioso (Herms, Tings et al. 1999, Brown 2001, Sales, Hassig et al. 2002). La expresión de PrP^C está regulada a lo largo del desarrollo del SNC (Manson, West et al. 1992, Tremblay, Bouzamondo-Bernstein et al. 2007). Se ha descrito que los niveles de la proteína incrementan desde edad embrionaria hasta edad postnatal (en ratón), con patrones de expresión específicos según la región cerebral, el tipo celular y las propiedades neuroquímicas de cada neurona (Lazarini, Deslys et al. 1991, Miele, Alejo Blanco et al. 2003, Tremblay, Bouzamondo-Bernstein et al. 2007).

¿CÓMO LLEGA PrP^{Sc} A INFECTAR EL SNC?

La comprensión de cómo la exposición a los agentes de las EETs, presente en el ambiente, conduce a la invasión y propagación al cerebro de un hospedador en particular, es de importancia fundamental para comprender varios de los aspectos involucrados en este tipo de enfermedades causadas por priones, incluyendo el control de la infección, el diagnóstico, la profilaxis y la identificación de enfoques terapéuticos. Hasta hoy en día el SNC resulta ser el único compartimento del organismo que presenta una degeneración clínica e histopatológicamente detectable (Aguzzi, Montrasio et al. 2001). Son varias las aproximaciones que se han realizado *in*

vitro con el fin de reproducir la infección y la replicación del prión. Varias líneas celulares, tanto neuronales como no neuronales (Grassmann, Wolf et al. 2013) y neuroesferas (Iwamaru, Takenouchi et al. 2013) de origen no humano han sido infectadas de forma eficiente y son capaces de mantener el proceso replicativo. Asimismo, el tratamiento *in vitro* con un péptido sintético perteneciente a la región central de PrP^C parece reproducir los eventos que se producen en el cerebro, a nivel celular, en los últimos estadios de la patología priónica (Aguzzi, Montrasio et al. 2001, Gavin, Braun et al. 2005, Mabbott and MacPherson 2006, Vilches, Vergara et al. 2013).

Existen diferentes vías de entrada de priones en el organismo. Es interesante observar que la propagación de priones también puede depender de su sitio de entrada, el huésped; así como, la dosis y PrP^C genotipo del huésped (Kovacs and Budka 2008). Dicha propagación sigue una secuencia bien definida: (1) acumulación de priones en los tejidos linfoides; (2) neuroinvasión, que consiste en la propagación de la PrP^{Sc} desde los tejidos linfoides al sistema nervioso periférico (SNP); (3) la difusión dentro del cerebro y la médula espinal (SNC) y (4) la propagación centrífuga desde el SNC a otros sitios periféricos como los músculos (Beekes and McBride 2007).

En el caso de exposición al patógeno por consumo de alimentos contaminados, como es el caso de *ECJv*, se ha demostrado infectividad en los tejidos periféricos a los 4 meses post-infección (Ponz, Monteagudo et al. 2002). El agente infeccioso es capaz de atravesar el epitelio intestinal, a nivel de la placa de Peyer ileal, donde las células M adyacentes parecen jugar un papel importante, al captar la proteína sin degradarla y presentarla como antígeno al sistema linforreticular (SLR) y posteriormente acumularla en los tejidos linfoides tales como el bazo, los ganglios linfáticos o las amígdalas, entre otros. Desde aquí, los priones pueden replicarse y colonizar el sistema inmune a través de la infección de linfocitos, macrófagos y células dendríticas de los centros germinales, que expresan cantidades considerablemente altas de PrP^C (Cashman,

Loertscher et al. 1990, Kitamoto, Muramoto et al. 1991, Aguzzi and Calella 2009). El agente causal pasa al SNC a través de una de las siguientes rutas: directa a través del SNP o indirectamente, por el SLR (Beekes and McBride 2000, Mabbott and Bruce 2001). En el caso de la ruta directa la PrP^{Sc} asciende retrógradamente a través de las fibras eferentes del sistema nervioso simpático y parasimpático (Beekes, McBride et al. 1998, McBride, Schulz-Schaeffer et al. 2001), alcanzando la médula espinal y finalmente el encéfalo. Una vez que la infección ha alcanzado el cerebro, se puede propagar en direcciones tanto anterógrada como retrógrada (Beekes, Baldauf et al. 1996). Por ejemplo, a partir de un estudio en hámster inoculados por vía oral con *scrapie*, se observó que una cantidad sustancial de PrP^{Sc} estaba presente en diferentes músculos, incluyendo la lengua, proporcionando la primera evidencia de una diseminación de la PrP^{Sc} desde el SNC a lugares periféricos (Bosque, Ryou et al. 2002) (**Figura 10**).

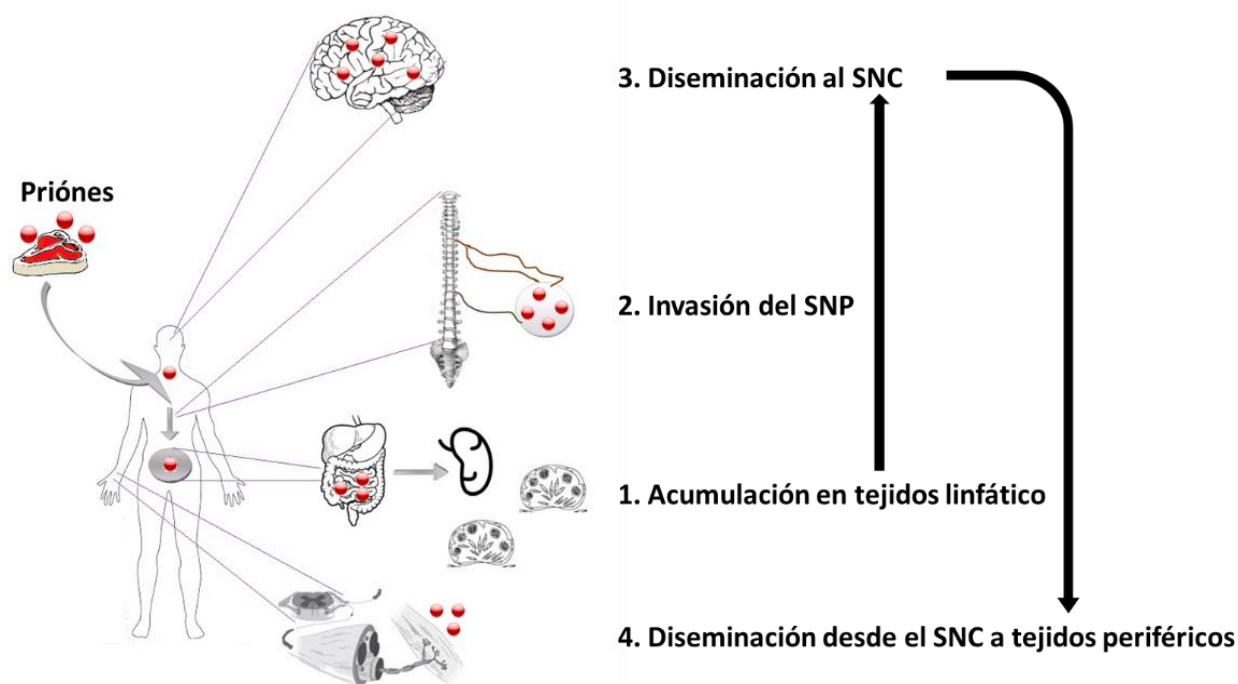


Figura 10. Fases de la propagación de priones en el organismo. 1) Acumulación de priones en los tejidos linfáticos; 2) neuroinvasión, donde el prion se propaga a partir de los tejidos linfáticos al sistema nervioso periférico (SNP); 3) diseminación hacia el sistema nervioso central (SNC) (cerebro y médula espinal)., 4) Diseminación retrogradada y anterógrada desde el SNC hacia zonas periféricas como músculos (Mabbott and MacPherson 2006).

También se ha detectado presencia de priones en la saliva, la orina, la placenta y en las heces de animales infectados, por lo que también suponen un elemento de riesgo para la transmisión del prión por vía oral (Gough and Maddison 2010). Además de esta vía, también se han descrito otras formas de neuroinvasión. Finalmente, también se ha reportado la transmisión eficaz de priones por aerosoles, con invasión de estructuras neuronales desde las vías respiratorias sin necesidad de una replicación previa del agente infeccioso en los órganos linfoides (Haybaeck, Heikenwalder et al. 2011).

FORMAS DE PROPAGACIÓN CELULAR DE LA PrP^{Sc}

En las diferentes etapas de su viaje letal para el SNC, la PrP^{Sc} se transfiere de una célula a otra y este tránsito puede implicar varios mecanismos y, como se ha mencionado, probablemente depende de los tipos de células, las cepas que infectan y la especie huésped.

Entre los posibles mecanismos implicados en la transmisión de priones a nivel celular se cree están: el contacto célula a célula a través de la conversión de PrP^C huésped en la superficie celular sin que se internalice la PrP^{Sc} donante; en asociación con exosomas secretados, microvesículas, dimsemiciñon extracelular; por difusión a través de túneles de nanotubos (TNTs), entre otros (**Figura 11**).

A continuación, se detalla una breve descripción de algunos mecanismos de propagación:

Contacto célula-célula

De los ensayos hechos por Kanu en el 2002 (Kanu, Imokawa et al. 2002) y Paquet en el 2007 (Paquet, Langevin et al. 2007), demostraron que la transmisión de priones necesita un estrecho contacto célula-célula y que la infección no puede ser transmitida por las células infectadas cuando hay una separación física entre las células infectadas y las no infectadas. Sin embargo, en estos trabajos los autores no han postulado un modelo de la transmisión. Solo han sugerido que el mecanismo podría implicar la conversión de PrP^C en la célula receptora por el

contacto con PrP^{Sc} presentes en la membrana plasmática de una célula infectada. Por otra parte, se piensa que la transferencia de cuerpos apoptóticos infectados en células no infectadas también podría transmitir la infección a las no apoptóticas (Kanu, Imokawa et al. 2002, Paquet, Langevin et al. 2007).

Por exosomas

Los exosomas son pequeñas vesículas con un diámetro de ~40-100 nm generadas por una invaginación de las membranas limitantes de los cuerpos multivesiculares (del inglés *multivesicular bodies*, *MBVs*) y que se liberan en el espacio extracelular después de la fusión de los *MBVs* con la membrana plasmática. Estas vesículas están involucradas en la comunicación intercelular mediante la transferencia no sólo de proteínas transmembranales, sino también de los ácidos nucleicos (Simons and Raposo 2009). Se ha reportado que posiblemente las células pueden liberar priones cuando están asociadas a exosomas (Fevrier and Raposo 2004, Vella, Sharples et al. 2007), por otra parte, en un modelo animal con ratones sanos, donde se les inyectó intracerebralmente partículas exosomales que contenían priones purificados dio como resultado una infección priónica (Fevrier and Raposo 2004).

Microvesículas

Además de las vesículas de origen exosomal, un reciente estudio describió la participación de microvesículas (MVs) en la difusión de priones. Las MVs son pequeñas vesículas (~40-1000 nm) que se forman a partir de la membrana plasmática de la célula para ser liberadas al medio extracelular y cuya producción responde a diferentes estímulos como una lesión, la apoptosis o la inflamación (Mattei, Barenco et al. 2009). Mattei y colaboradores demostraron que la PrP^{Sc} se liberaba de las células neuronales de ratones infectados en asociación con las MVs, dando como resultado la infección tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otra parte, se ha demostrado que la sangre; así como, el plasma de animales infectados experimentalmente con una EET pueden transmitir la enfermedad (Cervenakova, Yakovleva et al. 2003, Ludlam and Turner 2006). Por lo que

posiblemente las MVs podrían ser los vehículos para la transmisión de priones a través de sangre infectada.

Diseminación extracelular de formas truncadas

La presencia de una forma truncada de PrP^{Sc} en la zona C-terminal en el citoplasma, puede ser resultado de las acciones de una fosfolipasa o actividad de una proteasa, lo cual podría permitir la diseminación de PrP^{Sc} en las células vecinas no infectadas (Lewis and Hooper 2011). Un estudio hecho con cerebros de hámster describió que alrededor del 15% de PrP^{Sc} estaba presente en una forma truncada. Esta forma resulta de la escisión de zonas de PrP^{Sc} debidos a la proteólisis y la subsecuente liberación de péptidos bioactivos (Stahl, Borchelt et al. 1990) al medio extracelular.

Nanotubos (TNTs)

Los TNTs fueron descubiertos hace pocos años como una nueva forma de comunicación de célula a célula (Rustom, Saffrich et al. 2004).

Recientemente se demostró que los TNTs formados entre células neuronales, eran capaces de transferir la PrP^C y la PrP^{Sc} (priones exógenos) a neuronas vecinas en células en cultivo, dado que en presencia de trunculina que en cantidades nanomolares bloquea la formación de TNTs, se evitaba la transferencia de partículas de PrP^{Sc} a las células vecinas. Este estudio demostró que los TNTs son una vía eficaz para la difusión de PrP^{Sc} en las células neuronales (Gousset, Schiff et al. 2009).

Así mismo se ha observado que la proteína priónica puede viajar a través de los TNTs ya sea en la superficie o dentro de vesículas, ya que diversos estudios demostraron que una fracción importante de PrP^{Sc} (50%) estaba dentro de los TNTs, y colocalizaba con marcadores del compartimiento de reciclaje endocítico (REC) en células ScCAD (Zhu, Victoria et al. 2015).

Sorprendentemente, el REC ha demostrado ser uno de los sitios a nivel intercelular de conversión de PrP^C-PrP^{Sc} (Marijanovic, Caputo et al. 2009).

La transferencia de partículas de PrP^{Sc} a través TNTs no se limita a los co-cultivos neuronales, sino también se ha visto en modelos celulares de médula ósea, células dendríticas y neuronas de cultivos primarios (Gousset, Schiff et al. 2009). En total, estos estudios sugieren que los TNTs posiblemente podrían desempeñar un papel crítico *in vivo* en la propagación de priones en el SNC y SNP.

Recientemente, Wang y colaboradores han observado un comportamiento similar para las partículas intracelulares de beta amiloide en astrocitos y neuronas (Wang, Cui et al. 2011) y apoyando la idea de que las EETs y otras enfermedades neurológicas podrían utilizar a los TNTs como mecanismo de propagación intercelular.

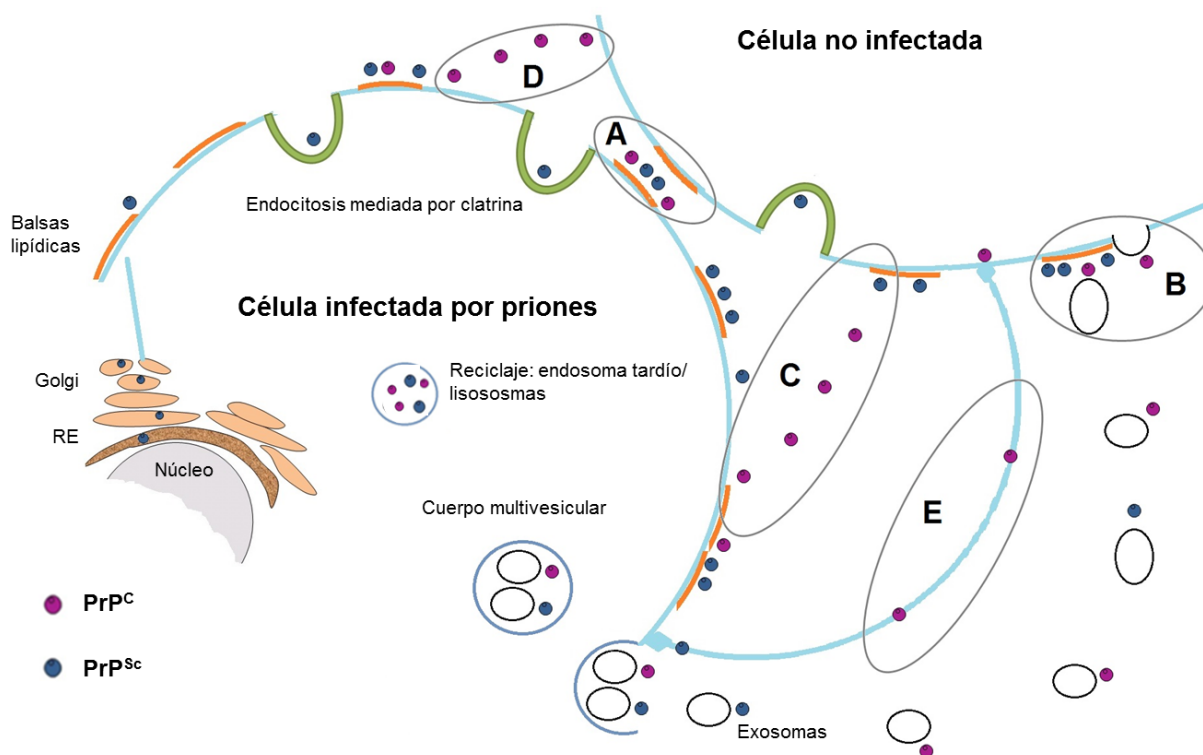


Figura 11. Mecanismos propuestos para la propagación de priones por contacto célula-célula. transmisión de priones mediante el contacto directo célula-célula (conversión de la PrP^C de la célula recipiente por contacto con la PrP^{Sc} de la célula infectada). (B) transmisión de priones a través de PrP^{Sc} asociados a exosomas. Representada la interacción directa entre la PrP^{Sc} asociada a exosomas con la PrP^C

asociada a la célula y su incorporación a la membrana plasmática mediante la fusión de la membrana plasmática con la membrana exosomal. (C) liberación de una forma truncada de PrP^{Sc} al medio extracelular y su desplazamiento hacia una célula no infectada. (D) Transferencia directa o por microvesículas. (E) propagación de PrP^{Sc} a través de nanotubulos en sociacion con pequeñas vesículas de origen lisosomal. El mecanismo (A) representado a través de la PrP asociada a balsas de lipidos, también podría involucrar PrP no asociada a esas balsas de lipidos. El mecanismo (D) está representado por la transferencia directa de PrP^{Sc} entre las membranas de la célula, aunque también podría producirse la captación de la PrP^{Sc} asociada a la membrana de microvesículas (MVs) producidas directamente por extrusión de la membrana plasmática de la célula infectada y su transmisión directa a través de la fusión de la membrana de las MVs con la membrana plasmática de la célula recipiente no infectada. (Modificado de (Lewis and Hooper 2011).

MOLÉCULAS COFACTORES DE LA CONVERSIÓN DE LA PrP

Dado que el cambio conformacional de la PrP^C a la PrP^{Sc} en ausencia de agregados de la PrP^{Sc} puede ocurrir de forma espontánea, la formación de priones espontáneos podría estar catalizada por la presencia de ciertos cofactores (Silva, Gomes et al. 2010, Gomes, Vieira et al. 2012). En consecuencia, estos supuestos cofactores podrían también acelerar la conversión de la PrP mediante la adición de semillas de PrP^{Sc}. Estudios hechos *in vitro* sugieren que la conversión de la PrP en un sistema sin células que usa sólo proteínas purificadas (Kocisko, Come et al. 1994) es menos eficiente que la técnica de *PMCA* (del inglés *Protein Misfolding Cyclic Amplification*) donde se emplean homogeneizados de cerebro crudo (Castilla, Saa et al. 2005). Esto indica que se requieren factores adicionales para una conversión eficiente y que el homogeneizado cerebral seguramente contenga esos factores que a continuación se describen (**Figura 12**).

Cofactores no metálicos para la conversión de priones

Han sido identificados muchos ligandos potenciales para la PrP^C, entre los cuales se encuentran las moléculas de adhesión celular, las moléculas de la matriz extracelular, los glicosaminoglicanos (GAGs) y los ácidos nucleicos. Estos cofactores facilitan la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} cuando se utilizan priones sintéticos de origen recombinante (Wang, Wang et al. 2010).

Iones metálicos como cofactores para la conversión priónica

Se han observado alteraciones en los niveles de hierro, cobre y manganeso en el cerebro de animales con prionopatías (Jackson, Murray et al. 2001, Hijazi, Shaked et al. 2003, Sigurdsson, Brown et al. 2003, Giese, Levin et al. 2004, Kim, Kim et al. 2005, Choi, Lee et al. 2013).

Numerosos estudios han analizado el efecto de los iones metálicos en la resistencia a PK pero los resultados son a menudo contradictorios (revisado por (Choi, Kanthasamy et al. 2006, Rana, Gnaneswari et al. 2009, Singh, Das et al. 2010).

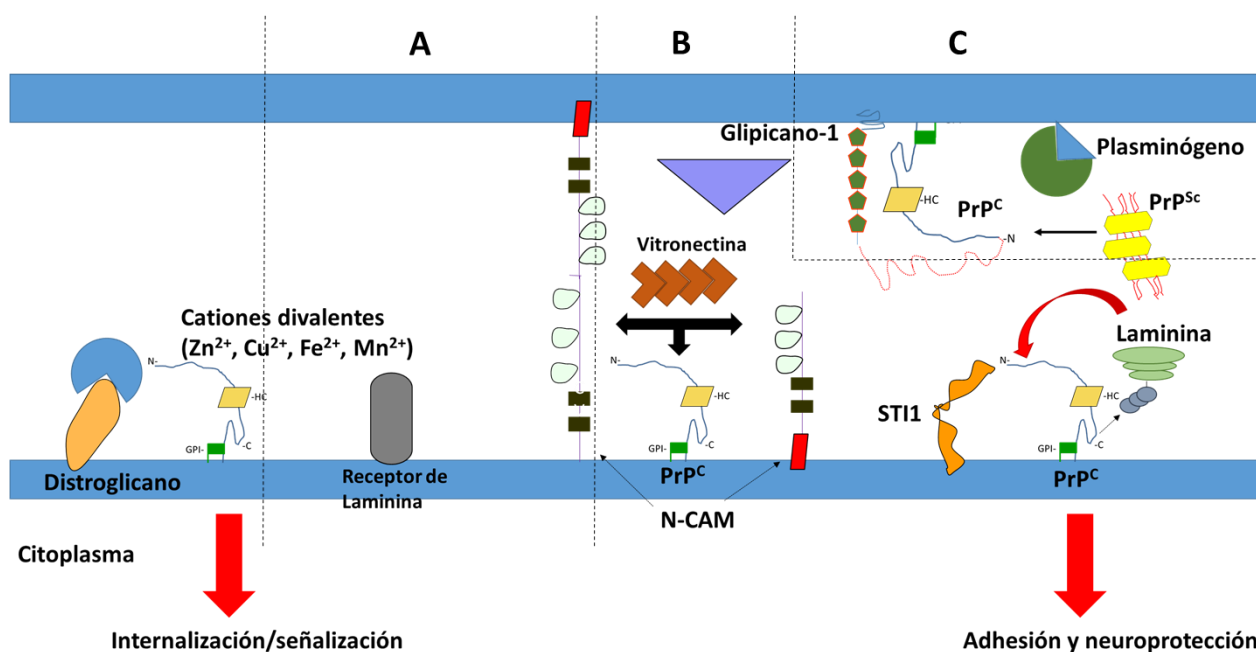


Figura 12. Moléculas asociadas con la interacción de PrP en la membrana plasmática y espacio extracelular. Se cree que moléculas extracelulares y pertenecientes a la superficie celular que tienen una interacción física con PrP, modulan funciones asociadas con el proceso de conversión de PrP^C y/o PrP^{Sc}. (A) Internalización de PrP al tráfico endocítico (endocitosis mediada por clatrina y/o mecanismos mediados por caveolina) y/o asociación directa con proteínas transmembrana para desencadenar la señalización intercelular. (B) Proyecciones/adhesión y/o neuroprotección de neuronas, y (C) Proteínas asociadas al proceso de conversión de PrP^C a PrP^{Sc}. Abreviaturas: proteína de adhesión celular neuronal, *neuronal cell-adhesion molecule* (N-CAM); fosfoproteína inducida por estrés, *stress-induced phosphoprotein* (STI1); β -secretasa 1, *β -secretase 1* (BACE1); proteína priónica celular (PrP^C); Proteína prión infecciosa (PrP^{Sc}); hierro (Fe); cobre (Cu); zinc (Zn), manganeso (Mn).

MODELOS CELULARES DE INFECCIÓN

En la actualidad la detección de priones constituye un gran reto científico dado la baja sensibilidad de los métodos bioquímicos e inmunológicos y la complejidad de los modelos animales existentes.

Hasta la fecha no se conocen a ciencia cierta los mecanismos por los cuales se propagan los priones, los mecanismos que conducen a una toxicidad celular, el mecanismo que les confiere una mayor o menor susceptibilidad a cada cepa de priones para desarrollar la enfermedad en los individuos dependiendo de su genotipo en *PRNP* o el motivo por el cual tienen un especial tropismo por ciertas zonas cerebrales. La carencia de tratamientos y la falta de herramientas de diagnóstico precoz, hacen indispensable el desarrollo y uso de herramientas más novedosas, por lo que hoy en día se han volcado las miradas hacia el uso de modelos celulares *in vitro* (Tabla II).

La principal ventaja que tienen los cultivos celulares es que se tratan de modelos de bioensayo más prácticos y sensibles que permiten estudiar la propagación de los priones en un entorno bioquímico simple, sin tener tantas variables no controladas como en un modelo animal (Beranger, Mange et al. 2001). Los modelos animales suelen ser más costosos, necesitan tiempos prolongados de incubación y en ocasiones, para acortar el tiempo requerido para el estudio de los priones, se han utilizado especies que no son susceptibles de forma natural a la infección por priones. Por todo ello, el desarrollo de modelos celulares *in vitro*, nos facilitará el estudio de forma pormenorizada de las incógnitas que envuelven a la proteína prión, para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas que inhiban la replicación de los priones (Ghaemmaghami, Phuan et al. 2007).

Por otro lado, en los últimos años se han generado distintos métodos *in vitro* que permiten amplificar o multiplicar el prión sin necesidad de utilizar cultivos celulares, tal es el caso de la *PMCA* (Saborio, Permanne et al. 2001, Castilla, Saa et al. 2005). Sin embargo, estos métodos libres de células no permiten analizar el efecto de la infección del prión en la célula, ni son

accesibles en cualquier laboratorio, por lo que los cultivos celulares representan un modelo idóneo para el análisis de aspectos relevantes de estas enfermedades.

Hasta la fecha, sólo existe un número limitado de cultivo celulares útiles para la propagación del prión y la mayoría de ellos son derivados de roedores (rata, ratón y conejo); muy pocas líneas provienen de otras especies afectadas (bovino, ovino y de primates o humanos). Es muy importante considerar la barrera a la transmisión. El factor más importante son las diferencias que existan entre la estructura primaria de PrP^C de la especie donante (inóculo) y la especie receptora (hospedador) (Scott, Foster et al. 1989, Prusiner, Scott et al. 1990), ya que las diferencias entre la secuencia de aminoácidos de la PrP^{Sc} que actúa como inóculo y la secuencia aminoacídica de la PrP^C de la especie receptora, determinan el grado de transmisibilidad (Scott, Groth et al. 1993).

Los modelos celulares más utilizados en los últimos años son principalmente de tipo neuronal, ya que son los que expresan en mayor medida la PrP^C, pero otros tipos celulares también son susceptibles (Tabla II.I y II.II). Los modelos de cultivos celulares empleados para estudios de infección por priones, han ayudado a caracterizar el procesamiento de la PrP^C, tráfico intracelular, localización de la proteína dentro de los compartimentos celulares y estudiar las posibles moléculas que interactúan con la PrP (Shyng, Huber et al. 1993, Shyng, Heuser et al. 1994, Shyng, Lehmann et al. 1995, Pauly and Harris 1998, Taylor and Hooper 2007). Así mismo, dichos modelos han ayudado a dilucidar exhaustivamente los mecanismos de conversión de PrP^{Sc} y a la identificación de factores celulares que mejoran y/o promueven la infectividad, por lo que los modelos celulares también son útiles para estudios dirigidos a la detección de fármacos anti-priones. Sin embargo, no existen buenos modelos celulares para el estudio de los priones humanos.

A continuación, se describen brevemente los distintos tipos de modelos celulares empleados hasta el momento y el fundamento para presentar las neuronas derivadas de células reprogramadas humanas como modelo celular *in vitro*, objeto de este trabajo.

1.- Líneas celulares neuronales

Los primeros estudios de infección hechos sobre líneas de origen neuronal, se realizaron en líneas celulares de neuroblastoma (Race, Fadness et al. 1987, Butler, Scott et al. 1988) o células de Schwann (Follet, Lemaire-Vieille et al. 2002). Estas líneas celulares mostraron que algunas cepas de priones producían cambios fenotípicos y se logró obtener una infección neuronal persistente (Race, Fadness et al. 1987, Schatzl, Laszlo et al. 1997). Las células de la línea Neuro2a (N2a), una línea derivada de neuroblastoma murino con rápida replicación, se siguen empleando para estudiar los mecanismos de generación y tráfico de la PrP^{Sc} (Taraboulos, Raeber et al. 1992, Nishida, Harris et al. 2000). Un 90% de ellas mantienen la infectividad por un largo periodo de tiempo (Race, Fadness et al. 1987, Butler, Scott et al. 1988, Race, Caughey et al. 1988, Bosque and Prusiner 2000, Mahal, Baker et al. 2007). Estas células han sido particularmente útiles en la determinación de acontecimientos importantes en la producción de PrP^{Sc}, tales como la acumulación de PrP^{Sc} en el citoplasma de las células infectadas, su conformación post-traslacional en los diferentes compartimentos subcelulares (Taraboulos, Serban et al. 1990, Taraboulos, Raeber et al. 1992, Vey, Pilkuhn et al. 1996), así como en ensayos de agentes terapéuticos (Caughey, Raymond et al. 1998, Supattapone, Nguyen et al. 1999). Las células subclonadas de N2A han llevado a la identificación de poblaciones clonales que varían en la susceptibilidad a la infección (Bosque and Prusiner 2000), como el clon N2a-PK1, que muestran una susceptibilidad preferencial hacia ciertas cepas de priones (Mahal, Baker et al. 2007, Browning, Baker et al. 2011).

Otras líneas derivadas de neuroblastoma incluyen las líneas C-1300 y NIE115. Estas células son altamente permisivas para la infección y son susceptibles a ciertas cepas de priones, tales

como la cepa RML (Laboratorio de las Montañas Rocosas) la cepa Chandler y la cepa Fukuoka (PrP^{Sc} humana adaptada a ratón) (Race, Fadness et al. 1987, Butler, Scott et al. 1988). Además, la selección de sub-clones de células N2a con una mayor susceptibilidad a diversas cepas, permitió que la cepa ME7, una cepa difícil de transmitir, se replicara en estos cultivos (Bosque and Prusiner 2000). Las células N2a que sobreexpresan PrP^C también son fácilmente infectadas por tres cepas de priones adaptadas en ratón (Chandler, 139A y 22L) (Nishida, Harris et al. 2000). Hallazgos recientes donde utilizan las células N2a para la replicar del inoculo *ECJ*, sugieren que estas células mantienen el repertorio completo de factores celulares necesarios para mantener la infectividad (Pulford, Reim et al. 2010).

Así mismo, las líneas de neuronas murinas hipotalámicas como la GT1, han mostrado susceptibilidad hacia la replicación de priones adaptadas en ratón (Schatzl, Laszlo et al. 1997). Estas células expresan cantidades elevadas de PrP^C y son aún más susceptibles a ser infectadas que las células N2a (Nishida, Harris et al. 2000). Además, las células GT1 no requieren la clonación adicional para la producción de cultivos infectados crónicamente. La permisividad de las células GT1, las ha convertido en una herramienta manejable para el análisis de cepas de priones adaptada en ratón (Arima, Nishida et al. 2005) y se han utilizado para replicar la *ECJ* humana también adaptada en ratón (Nishida, Katamine et al. 2005) (Tabla II). Las líneas N2a, GT1 y RK13 son útiles para la propagación de priones ovinos y murinos y algunos de origen bovino.

Otras líneas utilizadas son la PC12 de feocromocitoma de rata (Rubenstein, Deng et al. 1991) o la HaB de hámster (células inmortalizadas espontáneamente). Todas estas líneas neuronales producen continuamente PrP^{Sc} tras ser infectadas, y si bien en general no muestran signos patológicos, las células GT1 infectadas pueden entrar en apoptosis (Schatzl, Laszlo et al. 1997) y las N2A presentan alteraciones en la fluidez de la membrana, pero manteniendo la viabilidad (Wong, Qiu et al. 1996, Harris 1999). La propagación de priones al inducir cambios muy sutiles en el fenotipo de los cultivos infectados, no permite confiar en los cambios morfológicos

generados (Caughey, Brown et al. 1994), por lo que es necesario utilizar cepas que han sido previamente adaptadas a la infección en roedores (Solassol, Crozet et al. 2003).

Por otra parte, las dificultades debidas a la barrera de transmisión (Prusiner 1982, Alleaume-Butaux, Nicot et al. 2015, De Lucia, Rinchon et al. 2015) se han intentado subsanar creando líneas celulares que expresen una PrP homóloga a la del inóculo (Vilette, Andreoletti et al. 2001). La creación de ratones transgénicos que expresan la PrP ovina, bovina o humana ha facilitado la obtención de líneas celulares que expresan respectivamente una PrP ovina, bovina o humana y que son homólogas al inóculo en estudio (Laude, Vilette et al. 2002, Archer, Bachelin et al. 2004).

2.- Cultivos primarios neuronales y otros

La infección de células primarias en cultivos disociados obtenidos a partir de neuronas de ratón embrionario o neonato, sobre todo de cerebelo, ha demostrado ser un modelo de gran valor, en particular para distinguir las lesiones causadas por la PrP^{Sc} de la respuesta del huésped que está desarrollando la prionopatía (Kaul, Garden et al. 2001). Las desventajas que tienen estos cultivos es que su uso se ve limitado por su nulo potencial de proliferación. Además, al ser murinos, los priones no murinos requieren de una adaptación previa en ratón o de la creación de modelos transgénicos que expresen la PrP^C de la especie origen del prión (Cronier, Laude et al. 2004), con las posibles variaciones sobre el agente original que ello conlleva. En neuronas granulares de cerebelo que sobreexpresan PrP^C bovina se logró la replicación de priones de la EEB (Cronier, Laude et al. 2004). Entre los modelos de cultivos neuronales utilizados con éxito en ensayos de infección con priones cabe mencionar los cultivos primarios de neuronas cerebelosas granulares y los cultivos primarios cortico-estriatales donde se ha analizado el efecto de la PrP en las conexiones sinápticas (Alleaume-Butaux, Nicot et al. 2015). También, se han utilizado estos cultivos en infecciones con un péptido sintético de la PrP (106-126) (Simon, Herva et al. 2014). En el caso de modelos celulares inoculados con priones humanos, uno de los únicos modelos donde

se ha mostrado una exitosa infección y propagación, es la lograda por Samia Hannaoui en el 2013. En este estudio se utilizaron cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo derivadas de ratones que expresan PrP humana con una metionina o una valina en el codón 129. En este modelo, se consiguió una acumulación progresiva de PrP^{res} después de la exposición a homogeneizados de cerebro de pacientes con *ECJ* de tipo esporádica, variante o iatrogénica (Hannaoui, Maatouk et al. 2013).

Otro tipo de cultivos primarios que se han utilizado son los cultivos de cortes organotípicos, con especial indicación para estudiar el tropismo que ejercen ciertas cepas de priones hacia áreas específicas del cerebro. Se han logrado replicar distintas cepas de *scrapie* (22L, RML y 139A) y de EEB ya sea previamente adaptadas en roedores u obtenidas de forma natural (Falsig, Julius et al. 2008, Falsig, Sonati et al. 2012, Cortez, Campeau et al. 2015).

Cultivos celulares gliales y mixtos

En los últimos años se ha estudiado la replicación de priones en células de tipo glial presentes en cultivos neuronales (Hernandez, Sarasa et al. 2014, Cortez, Campeau et al. 2015), así como en cultivos de astrocitos (Avrahami and Gabizon 2011, Sarasa, Martinez et al. 2012, Hernandez, Sarasa et al. 2014, Hollister, Lee et al. 2015), cultivos de microglía (Iwamaru, Takenouchi et al. 2007, Munoz-Gutierrez, Schneider et al. 2015, Munoz-Gutierrez, Aguilar Pierle et al. 2016), de fibroblastos (Hollister, Lee et al. 2015), y mioblastos (Dlakic, Grigg et al. 2007, Herbst, Banser et al. 2013).

Estudios hechos en cultivos celulares han demostrado que la glía (astroglía y/o microglía) puede propagar el prión a otras células adyacentes no neuronales (cultivos de astrocitos y fibroblastos meníngicos de hámster adulto) (Hollister, Lee et al. 2015). Se cree que estos tipos celulares internalizan a la PrP^{res} incluso más eficientemente que las propias neuronas, por medio de compartimentos endosomales/lisosomales que hacen que el prión sea transportado rápidamente a través del cuerpo de la célula o procesos celulares, incluidos los contactos entre

astrocitos y neuronas. Sin embargo, el papel de las células no neuronales en la iniciación y propagación de la infección a través del cerebro sigue estando poco claro.

El cultivo primario mixto de neuronas y células de la glía de rata (40% neuronas, 36% astrogía y 15% microglía), inoculado con el péptido sintético de PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ se demostró infectividad en todos los tipos celulares presentes (Xie, Shi et al. 2015). En otro estudio, utilizando cultivos primarios de neuronas derivadas de la corteza cerebral de hámster adulto, acompañado de astrocitos y fibroblastos, inoculados con *scrapie* 263K, se observó que el *scrapie* infectaba a astrocitos y fibroblastos. Los astrocitos internalizaron bien la PrP^{Sc} un día después de la inoculación, y cinco días más tarde la PrP^{Sc} se encontraba dentro del compartimento somatodendrítico de las neuronas y dendritas. Es importante destacar, que las células que acumulaban mayor cantidad de PrP^{Sc} (86%) eran las no neuronales, internalizando más eficientemente la PrP^{Sc} que las neuronales (Hollister, Lee et al. 2015).

3.- Células troncales neurales y mesenquimales

Cultivos primarios de células madre neuronales

Hace apenas una década se comenzaron a utilizar células madre neuronales (*NSC*) para la propagación *in vitro* del prión (Milhabet, Casanova et al. 2006). Estas células, se obtienen a partir de embriones o de las regiones neurogénicas del sistema nervioso central adulto. Las *NSC* pueden diferenciarse a distintos tipos celulares del SNC (Reynolds and Weiss 1992, Uchida, Buck et al. 2000) y pueden multiplicar la proteína prión a partir de muy poca dosis de homogeneizado de cerebro infectado. Si se utilizan células troncales de la misma especie afectada se elimina el problema de barrera de especie facilitando la replicación de los priones.

El modelo de cultivo celular utilizado a partir de las *NSC* es el de neuroesferas, (Giri, Young et al. 2006, Iwamaru, Takenouchi et al. 2013), que presenta ventajas como modelo celular para la propagación del prion (Herva, Relano-Gines et al. 2010), ya que es un cultivo no transformado que se autorrenueva. Las neuroesferas diferenciadas a partir de las *NSC*, son más similares a los

tipos celulares presentes en el cerebro que las líneas tumorales descritas en el apartado anterior. Iwamaru en el 2013, utilizó cultivos de neuroesferas aisladas de cerebros de ratones neonatales que no expresan la PrP^C y de ratones transgénicos que sobre expresan la PrP murina. Tras la exposición a PrP^{res} semipurificada de priones adaptados en ratón (Chandler, Me7, 227, EEB y GSS), los cultivos de neuroesferas que no expresan PrP^C, no mostraron infectividad tras la exposición a PrP^{res} semipurificada, mientras que las neuroesferas derivadas de ratones transgénicos, lograron replicar todas las cepas priónicas testadas (Chandler, Me7, 227, EEB y GSS), (Giri, Young et al. 2006, Iwamaru, Takenouchi et al. 2013).

Otros autores han realizado estudios con NSC obtenidas de modelos de ratones jóvenes o adultos, detectando PrP^{Sc} desde los 6 días post-inoculación, con un incremento exponencial a través del tiempo (Milhavet, Casanova et al. 2006). Relaño-Ginès y colaboradores utilizaron NSC adultas obtenidas a partir de ratones y llevadas a neuroesferas con posterior diferenciación a neuroblastos, neuronas y astrocitos. Estos cultivos fueron inoculados con la cepa ME7, observando infección celular a partir de los 2 días post inoculación, que se mantuvo a través del tiempo hasta el pase 30. Este estudio es notable porque las neuroesferas infectadas con priones se diferenciaron hacia el linaje de astrocitos y no hacia el neuronal, identificando así un defecto en la diferenciación neuronal (Relano-Gines, Lehmann et al. 2013).

A pesar de lo prometedor de estas líneas, existen muy pocos trabajos que muestren el aislamiento de “progenitores neuronales” de especies de interés en los estudios sobre priones, como son los rumiantes (Duittoz and Hevor 2001) o los primates incluida la especie humana por la dificultad en el aislamiento de NSC en estas especies.

Cultivos de células madre mesenquimales (MSC)

Las MSC son un tipo de células madre adultas que poseen las capacidades de autorrenovación y diferenciación. Se trata de células troncales adultas, es decir, células no diferenciadas, que se encuentran en los tejidos y órganos adultos. Poseen la capacidad de dar

lugar a células diferenciadas del tejido en el que residen y a un número limitado de tipos celulares de otros tejidos. Se han aislado *MSC* de la mayoría de los tejidos, aunque el tejido considerado como la mayor fuente de ellas es la médula ósea.

Para el estudio de priones, se han empleado *MSC* obtenidas de la médula ósea (Takakura, Yamaguchi et al. 2008, Akimov, Vasilyeva et al. 2009, Cervenakova, Akimov et al. 2011, Song, Honmou et al. 2011) y del estroma de bazo (Akimov, Yakovleva et al. 2008) de ratones. En este tipo de cultivo celular se ha podido replicar una cepa de la variante de Creutzfeldt-Jakob y de GSS adaptadas en ratón (Akimov, Yakovleva et al. 2008), en *MSCs* obtenidas a partir de sangre periférica (Mediano, Sanz-Rubio et al. 2015), y en líneas inmortalizadas derivadas de *hMSC* (Song, Honmou et al. 2011). Para que el prión se replique, no parece necesario que las células *MSC* sean diferenciadas a células neurales; de hecho, se ha demostrado la presencia de PrP^{res} en *MSC* en modelos murinos infectados experimentalmente y se ha propuesto que la infección de las *MSC in vivo* podría conducir a la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro (Takakura, Yamaguchi et al. 2008). También, se ha demostrado la presencia de PrP^{Sc} en las *MSC* obtenidas a partir de médula ósea tomadas en autopsias de pacientes fallecidos por *ECJ* (Takakura, Yamaguchi et al. 2008), proponiéndolo como un método alternativo de diagnóstico precoz de la enfermedad. Takakura y colaboradores proponen que las *MSC* de médula ósea expresan PrP por un largo periodo de tiempo, con lo cual podrían actuar como un reservorio para los agentes de las EET humanas. Sin embargo, existen resultados contradictorios en la bibliografía (Brown, Gibbs et al. 1994) que puede deberse entre otras a diferencias en el tiempo de obtención de la muestra en el transcurso de la enfermedad.

Tabla II. Líneas neuronales

Tabla II.I. Modelos de cultivos de células susceptibles a agentes de la encefalopatía espongiforme transmisible.

Nombre célula	Tejido origen o tipo de célula	Especies de origen	Cepa de priones	Referencias
1. Células derivadas del cerebro o neuronales				
N2A	Línea celular de neuroblastoma*	ratón	Chandler,RML, 139A, 22L, C506, Fukuoka-1, FU CJD	Butler, D.A. 1998; Nishida, N. 2000; Bach, C. 2009; Arjona, A. 2004; Enari, M. 2001; Markovits, P. 1983; Ostlund, P. 2001; Race, R. 1991; Scott, M.R. 1992
GT1	Línea celular del hipotálamo	ratón	Chandler,RML, 139A, 22L, ECJ, M1000	Nishida, N. 2000; Schatzl, H.M. 1997; Vella, L.J. 2007; Lewis, V. 2009; Arjona, A. 2004; Miyazawa, K. 2011
SN56	Línea celular septal colinérgica	ratón	Chandler, ME7, 22L	Baron, T.G. 2006
HpL3-4	Línea celular deficiente de PrP en el hipocampo, sobre la expresión ectópica de moPrP*	ratón	22L	Maas, E. 2007; Nunziante, M. 2011
CF10	Línea celular deficiente de PrP derivada del cerebro, sobre la expresión ectópica de moPrP	ratón	22L	McNally, K.L. 2009
SMB	Células cerebrales infectados con priones	ratón	Chandler, 139A, 22F, 79A	Clarke, M.C. 1970; Birkett, C.R. 2001; Kanu, N. 2002
CAD	Línea celular catecolaminérgica	ratón	RML, 22L, 22F, 79A, 139A, ME7	Mahal, S.P. 2007; Dron, M. 2009; Browning, S. 2011; Julius, C. 2008
MG20	Línea celular de la microglía que sobreexpresaPrP ^C	tg20 ratón	Chandler, ME7, EEB adaptada en ratón	Iwamaru, Y. 2007
PC12	Línea celular de feocromocitoma	rata	139A, ME7	Rubenstein, R. 1992; Rubenstein, R. 1984;
HaB	Línea celular derivada del cerebro	hámster	Sc237	Taraboulos, A. 1990
SH-SY5Y	Línea celular de neuroblastoma	humano	CJD _h homogeneizado de cerebro	Ladogana, A. 1995
MDB	Células cerebrales primarias de ciervo	ciervo mulo	CWD	Raymond, G.J. 2006
2. Células derivadas del cerebro o neuronales primarias				
CGN	Neuronas granulares de cerebelo que sobreexpresan PrP ^C bovina	tgov ratón	mo 127S	Cronier, S. 2004
CAS	Astrocitos de cerebelo que sobreexpresan PrP ^C bovina	tgov ratón	mo 127S	Cronier, S. 2004
NSC	Células madre neuronales	ratón	22L, RML	Giri, R.K. 2006; Milhavet, O. 2006; Herva, M.E. 2010
3. Células no neuronales				
C2C12	Línea celular de mioblastos esqueléticos	ratón	22L	Dlagic, W.M. 2007
L fibroblastos	Línea celular de fibroblastos	ratón	ME7, Chandler	Clarke, M.C. 1976
L929	Línea celular de fibroblastos	ratón	22L, RML, ME7	Vorberg, I. 2004
NIH/3T3	Línea celular de fibroblastos	ratón	22L	Vorberg, I. 2004
MSC-80	Línea celular de Schwann	ratón	Chandler	Follet, J. 2002
MovS	células de Schwann a partir de Ganglios de la raíz dorsal	tgov ratón	PG127, SSBP/1, aislamientos de campo infectados con scrapie	Neale, M.H. 2010; Archer, F. 2004
moRK13	Línea de células epiteliales que expresan PrP ^C ratón	conejo	Fukuoka-1, 22L, Chandler, M1000, mo ECJe	Vella, L.J. 2007; Courageot, M.P. 2008; Lawson, V.A. 2008
voRK13	Línea de células epiteliales que expresan PrP ^C de ratón de campo	conejo	vo BSE	Courageot, M.P. 2008
ovRK13/ RoV9	Línea de células epiteliales que expresan PrP ^C ovino	conejo	PG127, LA404, SSBP/1,	Vilette, D. 2001; Sabuncu, E. 2003; Neale, M.H. 2010

			aislamiento de campo infectados con scrapie	
elkRK13	Línea de células epiteliales que expresan PrP ^{sc} alce	conejo	CWD	Bian, J. 2010; Kim, H.J. 2012
4. Células no neuronales primarias				
BM-derivadas de MSC	Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea	tgov ratón	Fukuoka-1	Akimov, S. 2009
BM-derivadas de células semejantes a MSC	Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea	tgov ratón	Fukuoka-1	Cervenakova, L. 2011

*Células sobreexpresan MoPrP-A o etiquetado con epítipo MoPrP^C o el anticuerpo 3F4. (Modificado de (Grassmann, Wolf et al. 2013).

Tabla III. Vías de difusión de priones en cultivo celular.

Línea celular de donantes infectados con priones	Cepa de priones	Difusión intracelular de priones	PrP ^{Sc} secretados	Referencias
N2a	22L	Sí, a través de medio acondicionado	Sí, asociado con exosomas	Alais, S. 2008
N2a	RML	No o ineficiente	No determinado	Schatzl, H.M. 1997; Ghaemmaghami, S. 2007
SMB	Chandler	Sí, a través de contacto directo con la célula	No determinado	Kanu, N. 2002
HpL3-4*	22L	Sí, a través de medio acondicionado	No determinado	Maas, E. 2007
NIH/3T3	22L	Sí, a través de medio acondicionado	Sí, asociado con exosomas	Leblanc, P. 2006
CAD	139A	Sí, vía TNTs	No determinado	Gousset, K. 2009
GTI	RML	Sí, a través de medio acondicionado	No determinado	Schatzl, H.M. 1997
GTI	FU CJD	Sí, a través de medio acondicionado	No determinado	Nishida, N. 2005
GTI	M1000	Sí	Sí, asociado con exosomas	Vella, L.J. 2007
ovRK13/ RoV9	PG127	Sí (ineficientemente)	Sí, asociado con exosomas	Fevrier, B. 2004; Paquet, S. 2007
moRK13	M1000	Sí	Sí, asociado con exosomas	Vella, L.J. 2007
Mov	PG127	Sí, a través de las proximidades de las células	Sí, asociado con exosomas	Fevrier, B. 2004; Cronier, S. 2004; Paquet, S. 2007
SN56	Chandler	Sí, a través de medio acondicionado	Sí	Baron, G.S. 2006

* Células expresan ectópicamente 3F4 o están etiquetadas con el epítipo MoPrP^C (Modificado de (Grassmann, Wolf et al. 2013).

4.- Células madre pluripotentes: *hESC* y *hiPSC*

Recientemente, varios modelos de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, ELA, SIDA, etc.) han sido establecidos mediante la derivación de neuronas a partir de células madre embrionarias humanas obtenidas a partir de embriones donados (Pickering, Minger et al. 2005), así como mediante reprogramación celular obteniendo *hiPSC* a partir de

diferentes tipos celulares extraídas de pacientes portadores de una mutación o que han desarrollado una enfermedad. El uso de las *hESC* y de las *hiPSC* como modelos para el estudio de enfermedades neurodegenerativas ha hecho que el mundo de los priones vuelque su mirada para su uso como modelo *in vitro*. Las células madre pluripotentes al tener un elevado potencial de proliferación y diferenciación a distintos tipos celulares son un excelente candidato para estudios *in vitro*. Además, la posibilidad de obtener células pluripotentes a partir de células de pacientes que han desarrollado algún tipo de prionopatía, representa una oportunidad para estudiar en profundidad los mecanismos patogénicos y los factores que dan origen a las distintas presentaciones de estas enfermedades (hereditaria, esporádica o iatrogénica).

Las *hESC* se derivan de la masa celular interna del blastocisto, siendo ésta su principal desventaja, dada la problemática ética y moral que rodea su uso. El hecho de que las *hiPSC* presenten las mismas características de auto-renovación y pluripotencia que las *hESC*, y la posibilidad de diferenciarlas al tipo celular de interés para el estudio de una enfermedad en concreto, han convertido estas células en el centro de interés para modelar enfermedades *in vitro*. En la actualidad, las *hiPSC* representan la fuente más viable, rápida y económica para la generación de neuronas en una cantidad suficiente y con la calidad necesaria a nivel funcional para la experimentación y estudio de las enfermedades neurodegenerativas, sobre todo de tipo genético.

La obtención de *iPSC* le valió el Premio Nobel de Medicina en 2012 a Shinya Yamanaka, por su trabajo en la reprogramación de células maduras somáticas a un estado pluripotente utilizando factores definidos. En 1962 John B Gurdon, que compartió el nobel con Yamanaka, fue el primer científico en utilizar la técnica de la transferencia nuclear de células somáticas para reprogramar con éxito un núcleo de la célula somática transfiriéndolo a un óvulo enucleado y no fertilizado, lo que llevó al desarrollo de un organismo viable (Gurdon 2013). La reprogramación celular se logró más tarde utilizando diversas estrategias técnicas tales como la fusión de células

somáticas con células madre pluripotentes (Tada, Takahama et al. 2001, Cowan, Atienza et al. 2005). En estas técnicas la célula somática o núcleo está expuesto a factores de reprogramación que están presentes en el citoplasma de las células pluripotentes. Esto llevó a Yamanaka a estudiar la expresión de 24 genes asociados a la pluripotencia con el fin de identificar la combinación mínima de factores requeridos para reprogramar fibroblastos de ratón a un estado pluripotente. En el 2006, el grupo de Yamanaka publicó que la reprogramación de una célula somática podría lograrse mediante la expresión ectópica de solo cuatro factores conocidos: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM) (Takahashi and Yamanaka 2006) (**Figura 13**).

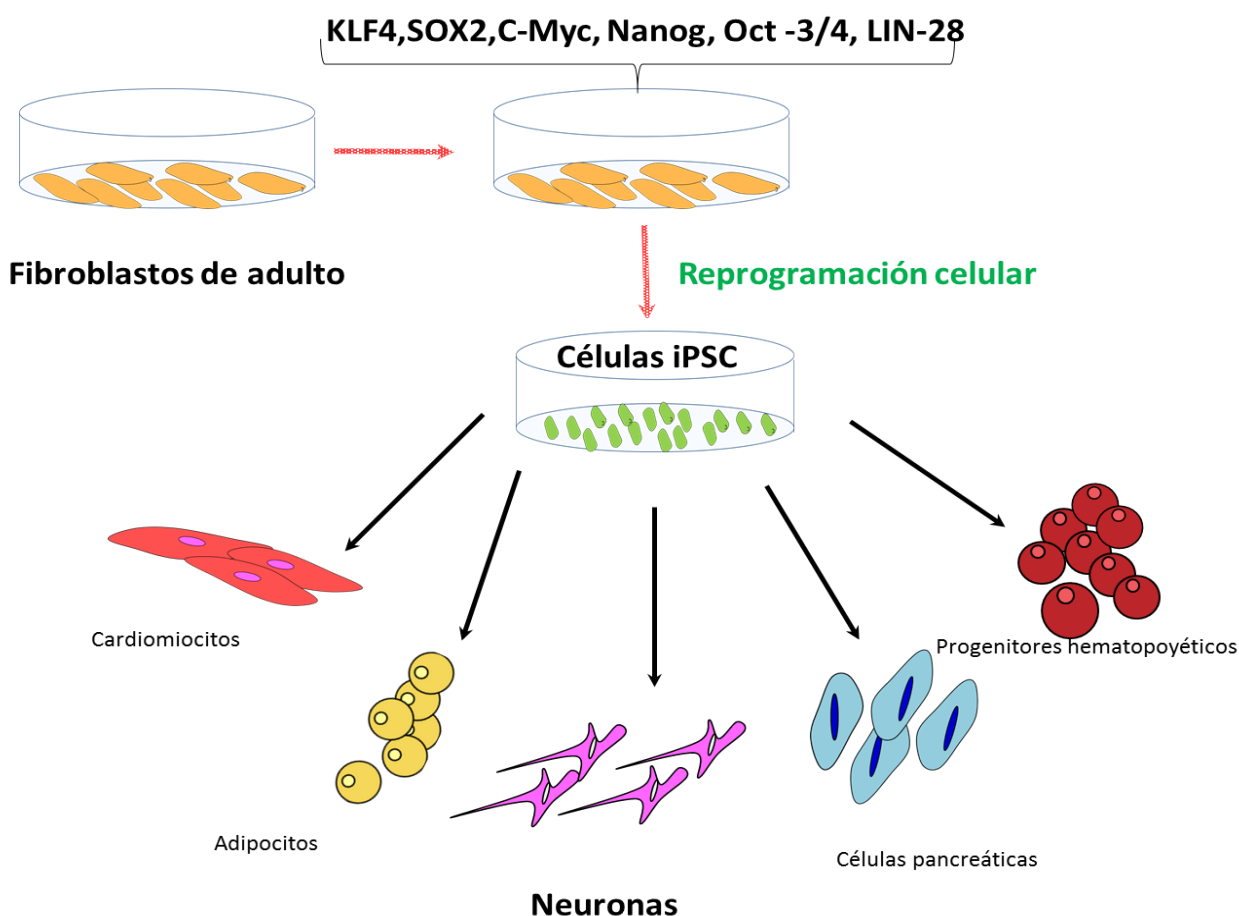


Figura 13. Reprogramación de fibroblastos a *hiPSC*. Reprogramación de fibroblastos por medio del uso de factores de transcripción y obtención de distintos tipos celulares a partir de las *hiPSC*.

Desde que las primeras *hiPSC* se derivaron con éxito, se han publicado una serie de protocolos y sistemas de reprogramación para mejorar su estabilidad a la hora de su uso como modelo *in vitro*. La reprogramación a *hiPSC* se ha realizado a partir de diversos tipos de células (fibroblastos, queratinocitos, linfocitos, células de sangre de cordón y progenitores neuronales, entre otros) y de diferentes especies (Masip, Veiga et al. 2010); con combinaciones de diferentes factores de pluripotencia (Yu, Vodyanik et al. 2007, Feng, Jiang et al. 2009, Heng, Feng et al. 2010) que se ha podido reducir (Huangfu, Osafune et al. 2008, Nakagawa, Koyanagi et al. 2008, Kim, Greber et al. 2009) y en algunos casos sustituir por pequeñas moléculas. También existe una amplia variedad de métodos para introducir los factores de reprogramación (Gonzalez, Boue et al. 2011) y actualmente se favorecen los métodos no integrativos. Las *hiPSC* resultantes han demostrado guardar una profunda similitud a las *hESC* derivadas de la masa celular interna del blastocisto, con capacidades similares de diferenciación (Boulting, Kiskinis et al. 2011), con una expresión génica y patrones epigenéticos prácticamente idénticos (Maherali, Sridharan et al. 2007, Okita, Ichisaka et al. 2007, Wernig, Meissner et al. 2007, Mikkelsen, Hanna et al. 2008, Guenther, Frampton et al. 2010). Este notable resultado ofrece nuevos enfoques para la investigación y aplicaciones terapéuticas, sustituyendo en gran medida las *hiPSC* a las *hESCs*, salvo casos concretos (Urbach, Bar-Nur et al. 2010).

Ventajas del uso de las *hiPSC* como modelos de enfermedad

Las *hiPSC* presentan una serie de ventajas que las convierten en excelentes candidatos para su uso como modelos de enfermedad: 1) son relativamente fáciles de obtener, 2) se pueden derivar de material de partida accesible como son las biopsias de piel, 3) potencialmente, se pueden diferenciar a un tipo celular muy específico para estudiar una determinada enfermedad, 4) ofrecen una fuente prácticamente ilimitada de material biológico para el estudio o detección de fármacos, 5) cuando proceden de pacientes portadores de mutaciones genéticas, no se requiere de ingeniería genética para crear el modelo patológico 6) se pueden utilizar paneles de

hiPSC con diferentes genotipos de la misma enfermedad para estudiar los aspectos específicos asociados casualmente a la mutación.

Desventajas del uso de las *hiPSC* para su uso como modelos de enfermedad

Aunque cualquier trastorno con una base genética es susceptible para que las *hiPSC* sean utilizadas para generar un modelo para el estudio de la enfermedad, no todas las enfermedades presentan los mismos retos. Las enfermedades monogénicas son más fáciles de modelar porque por lo general la base genética es conocida y sus fenotipos pueden ser confirmado claramente con un control negativo donde el gen no posea la mutación de interés. Enfermedades poligénicas y complejas son más difíciles de modelar debido a su fuerte componente ambiental. Del mismo modo, las enfermedades de aparición temprana son más fáciles de modelar. Otra característica importante a tener en cuenta son los tipos celulares afectados por la enfermedad y la existencia de protocolos de diferenciación robustos que pueden ser utilizados para derivar los fenotipos celulares de interés a partir de las *hiPSC*.

Algunas enfermedades pueden afectar el proceso de reprogramación, por lo que corregir previamente el defecto genético puede ser necesario para la generación de *hiPSC* (Raya, Rodriguez-Piza et al. 2009). El proceso de reprogramación y remodelación epigenética de la célula requieren de la división celular, por lo que los trastornos que afectan a la reparación del ADN, las vías de senescencia y la proliferación celular, o que implican mecanismos epigenéticos, puede hacer que la generación de *hiPSC* sea difícil o imposible. Por otro lado, dada la base epigenética del proceso de reprogramación, es posible que el fenotipo de la enfermedad no pueda ser recapitulado incluso aun cuando sea posible reprogramar a *hiPSC* (Urbach, Bar-Nur et al. 2010).

Como mencionamos anteriormente, hasta el momento no se han reportado ensayos de infección por priones en cultivos celulares derivados a partir de *hiPSC*, y es casi inexistente la información reportada sobre ensayos de infectividad con priones humanos utilizando modelos

derivados a partir de *hESC*. En el estudio de Krejciova en el 2011, utilizaron cuerpos embrionarios (EBs) derivados de siete líneas de *hESC* con la presencia del polimorfismo MM en el codón 129 de *PRNP* que fueron infectados con inóculos de EEB, *ECV*, *ECJe* (subtipo MM1 y VV2) y AD. Reportaron una internalización de la PrP^{Sc} humana y animal pero exclusivamente por un corto periodo de tiempo, ya que las células la eliminaron cuando se retiró el inóculo (Krejciova, Pells et al. 2011).

5.- Neuronas inducidas (*iN*)

Como ya hemos mencionado las técnicas de obtención de neuronas utilizando como fuente las *hESC* y las *hiPSC* han sido de gran ayuda para el desarrollo de modelos de enfermedades neurodegenerativas. Otra técnica que se ha utilizado más recientemente es la transdiferenciación o reprogramación directa, la cual es una técnica novedosa, fácil y rápida en comparación con la reprogramación a células madre pluripotentes. Esta técnica se basa en la sobreexpresión forzada de distintos factores de transcripción en una célula adulta para ser reconvertida en un tipo de célula distinta. Para ello es preciso conocer los factores de transcripción que determinan la identidad del tipo celular de interés (*master regulators*).

Conversión directa de fibroblastos a neuronas

El primer ejemplo de conversión directa entre las células pertenecientes a distintas capas germinales, fue demostrada por el grupo de Wernig y colaboradores, quienes fueron capaces de convertir fibroblastos de ratón en neuronas funcionales “neuronas inducidas” (del inglés, *induced Neurons, iN*) mediante la expresión forzada de tres factores de transcripción importantes para establecer la identidad de las neuronas telencefálicas: *Ascl-1* (*MASH1*), *Brn2* y *MYT1L* (Vierbuchen, Ostermeier et al. 2010). Un año más tarde con esta estrategia este grupo logró la conversión directa de fibroblastos humanos a *iN* (Marro, Pang et al. 2011) y de hepatocitos a *iN* (Pang, Yang et al. 2011). Hoy en día, la conversión directa de células somáticas accesibles, como son los fibroblastos dérmicos o las células de la sangre, a *iN*, se ha podido demostrar

sistemáticamente en células de ratón y humanas por varios grupos utilizando distintas combinaciones de transgenes (Vierbuchen, Ostermeier et al. 2010, Marro, Pang et al. 2011, Pang, Yang et al. 2011, Pfisterer, Wood et al. 2011, Ang and Wernig 2014, revision de Tanabe, Haag et al. 2015).

Por otro lado, en algunos estudios se han podido obtener subtipos específicos de neuronas tales como, *iN* dopaminérgicas (Caiazzo, Dell'Anno et al. 2011, Pfisterer, Kirkeby et al. 2011, Liu, Li et al. 2012), *iN* motoras (Son, Ichida et al. 2011), *iN* glutamatérgicas (Heinrich, Blum et al. 2010) y GABAérgicas (Heinrich, Gascon et al. 2011). Sin embargo, el fenotipo resultante es más difícil de controlar en la reprogramación directa que mediante la diferenciación (programación) de células iPS. La capacidad funcional *in vivo* se ha examinado en estudios donde han trasplantado *iN*, demostrando que estas *iN* sobreviven en el cerebro huésped (Torper, Pfisterer et al. 2013) y son capaces de revertir los déficits funcionales en un modelo de enfermedad de Parkinson (Kim, Su et al. 2011).

Así mismo, en estudios murinos se han podido convertir otros tipos de células *in situ* como astrogliá (Heins, Malatesta et al. 2002, Berninger, Costa et al. 2007) y pericitos en *iN* (Karow, Sanchez et al. 2012).

Una limitación que tienen los cultivos neuronales obtenidos a través de ésta técnica es, que las *iN* son post-mitóticas y por tanto no permiten una posterior expansión. Para evitar este problema, varios grupos han generado progenitores neuronales proliferativos que se puede amplificar *in vitro* y diferenciarse en diferentes tipos neuronales (Giorgetti, Marchetto et al. 2012, Han, Tapia et al. 2012, Lujan, Chanda et al. 2012, Thier, Worsdorfer et al. 2012, Castano, Menendez et al. 2014).

A pesar de que se ha demostrado la facilidad de derivar una población mixta de *iN* (Vierbuchen, Ostermeier et al. 2010) o subtipos específicos de *iN*, otra limitación es que la

eficiencia de conversión neuronal a partir de fibroblastos, es menor que el obtenido con las técnicas de *hESC* y *hiPSC* (Ladewig, Koch et al. 2013). Este hecho junto a la mayor flexibilidad en los protocolos de diferenciación nos inclinó a elegir la reprogramación a *hiPSC* en el proyecto actual.

En resumen, una alternativa atractiva a los modelos animales es el uso de modelos celulares, que tienen la ventaja de poder observar el comportamiento de los priones en periodos de tiempo más cortos y que son modelos más fáciles de mantener. Además, permiten hacer frente a la mayor parte de las cuestiones científicas relacionadas con la investigación sobre las EETs, tales como la comprensión de la biología celular fundamental de PrP^C, de los mecanismos que regulan la replicación de los priones, la identificación de los compartimentos celulares cruciales para la conversión de PrP^{Sc}, la caracterización de las vías de señalización, el testado de distintos agentes terapéuticos o la caracterización de distintas cepas.

Por último, la utilización de células humanas susceptibles permitirá estudiar los priones humanos, en el contexto celular adecuado, lo cual puede contribuir de forma significativa al desarrollo de opciones terapéuticas en el futuro.

OBJETIVOS

En un contexto donde actualmente es factible el desarrollo de nuevos modelos celulares derivados a partir de *hiPSC* utilizando como fuente fibroblastos humanos de pacientes que han desarrollado una EET genética, y siendo conscientes de que a día de hoy no se ha podido propagar ningún prión humano en un cultivo celular, se plantean los siguientes objetivos.

El **objetivo general** de este trabajo es el desarrollo de un nuevo modelo celular capaz de propagar priones humanos, y generado a partir de la reprogramación de fibroblastos provenientes de un paciente genéticamente susceptible de desarrollar una encefalopatía espongiiforme transmisible. **Los objetivos específicos propuestos son:**

- 1.-Determinar la expresión de PrP^C en las neuronas telencefálicas humanas derivadas de *hiPSC* obtenidas mediante la reprogramación celular de fibroblastos humanos.
- 2.-Analizar la presencia de formas de PrP resistentes a proteasas en las neuronas derivadas a partir de *hiPSC* reprogramadas de un paciente portador de la mutación Y218N en el gen *PRNP*.
- 3.-Evaluar el potencial uso de las neuronas derivadas a partir de las *hiPSC* humanas portadoras de la mutación Y218N como modelo de una enfermedad priónica familiar.
- 4.-Evaluar la susceptibilidad de las neuronas humanas derivadas de *hiPSC* portadoras de la mutación Y218N a la infección con varias cepas de priones humanas.
- 5.-Evaluar la susceptibilidad de las neuronas humanas derivadas de *hiPSC* sin mutaciones a la infección con varias cepas de priones humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de fibroblastos para la reprogramación celular

Se obtuvieron fibroblastos dérmicos derivados de explantes de biopsias de piel de la cara interna del brazo de una paciente de 61 años perteneciente a una familia con prionopatía familiar tipo GSS. El grupo del Dr. López de Munain identificó la mutación Y218N en la *ORF* (del inglés: *Open Reading Frame*) del gen *PRPN* en esta familia (Alzualde, Indakoetxea et al. 2010). Dicha mutación presenta un gran interés además de por la existencia de proteína del prión resistente a proteasas con un patrón atípico, por la inusual presencia de agregados neurofibrilares de la proteína Tau. En paralelo se obtuvieron fibroblastos control de un individuo sano de edad similar. Los cultivos primarios fueron preparados por el grupo del Dr. López de Munain en el Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia.

Historial del paciente a partir del cual se tomaron fibroblastos y se reprogramaron a *hiPSC*, para su posterior diferenciaron a neuronas telencefálicas.

Informe del caso

Mujer de 54 años que en la primera consulta de presentó con falta de concentración, apatía, labilidad emocional y crecientes dificultades en la planificación y ejecución de las acciones, durante la exploración neuropsicológica, se evidenció una ligera disfunción de la memoria, trastornos del lenguaje y de la comprensión verbal con disfunción ejecutiva. La exploración neuropsicológica evidenció una ligera disfunción de la memoria del tipo de recuperación, trastornos del lenguaje y la comprensión verbal con anomia conservado, así como una disfunción ejecutiva. En el *Mini Examen del Estado Mental (MMSE)* se evidenció una puntuación de 23/30.

Otros aspectos de la exploración neurológica fueron normales. La resonancia magnética craneal mostró una ligera atrofia frontotemporal. El electroencefalograma reveló enlentecimiento frontotemporal intermitente. Un nuevo electroencefalograma, 6 meses después, mostró actividad de fondo lento, con ondas delta intermitentes en el hemisferio izquierdo. En la actualidad, 10 meses después de la aparición, ella tiene dificultades con el lenguaje, con un deterioro en el conocimiento semántico, y la puntuación del MMSE ha bajado a 13/30.

TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES

Condiciones generales de mantenimiento de los cultivos celulares

Todos los cultivos de células se mantuvieron en una incubadora de CO₂ Steri-Cycle (371; Thermo Scientific™) a 37 °C con una atmósfera de aire del 95% y 5% de dióxido de carbono (CO₂), tomando medidas especiales para el cultivo de las *hiPSC* con la finalidad de evitar la diferenciación espontánea. Los medios de cultivo utilizados a lo largo de éste estudio se encuentran en las tablas III.

Contaje celular

Las células se tiñeron con azul tripán para excluir las células muertas y se visualizaron bajo el microscopio (Nikon Eclipse TS 100-F). Las células viables se contaron usando una cámara de recuento de Neubauer (6259M, Fisher Scientific Bioblock).

Cultivo de células somáticas (fibroblastos primarios)

Los fibroblastos humanos utilizados como control de la expresión de PrP^C y de la diferenciación neuronal (Tabla IV), fueron cultivados en DMEM (alto en glucosa, D6546-500ml; Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (InvitrogenTM-500ml), 2 mM L-glutamina (G7513-100ml; Sigma-Aldrich) y 1% penicilina y estreptomina (P/S) (D6546-100ml; Sigma-Aldrich). Se sembraron en nuevas placas una o dos veces por semana dependiendo de su ritmo de división celular. El medio de crecimiento se reemplazó cada tercer día.

Cultivo de células nodriza (*feeders*)

Con la finalidad de utilizar fibroblastos como células nodriza (*feeders*) alimentadoras y de soporte para las *hiPSC*, que aportan proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento a los medios de crecimiento celular se utilizaron los fibroblastos de prepucio “HFF1” de origen humano (*HFF1*, *SCRC-1041*, *ATCC* (Tabla IV)).

Los HFF1 se cultivaron sobre pocillos (5 x 10⁵ células/cm²/placa de 6 pocillos) previamente tratados con gelatina al 1% y en medio DMEM de alta glucosa suplementado con 10% SFB, insulina-transferrina-selenio (ITS-A 1X) (41400045-5 ml; Invitrogen), piruvato de sodio (51300044-10ml; Invitrogen), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (del inglés, *non essential aminoacids*, *NEAA*) (#12383-10 Nm; Gibco) y p/s al 0,5%. Los fibroblastos (Tabla IV) se mantuvieron por debajo del pase 15 y se utilizaron para la propagación y mantenimiento de las *hiPSC*.

Irradiación de células nodriza (*feeders*)

La proliferación celular de las células alimentadoras se inhibe por medio de irradiación gamma. Cuando las células alcanzan la confluencia establecida se tripsinizan, neutralizan y re-suspenden en medio de crecimiento. Se mantienen a 4°C hasta el momento de la irradiación. La irradiación se realiza con un máximo de 3 pulsos de rayos gamma (total de 50 Gy) y el procedimiento se lleva a cabo en la unidad de radiología del Instituto Oncológico de San Sebastián. Tras la irradiación las células se congelan en 90% de SFB y 10% DMSO (D2650-100ml; Sigma-Aldrich) para su almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido. Para preparar las células cada semana se descongelan los viales necesarios y se siembran (50.000/cm²) sobre una placa de 6 pocillos previamente tratada con gelatina al 0,1%.

Generación de *hiPSC*

Reprogramación de fibroblastos a *hiPSC*.

La reprogramación de los fibroblastos de origen dérmico obtenidos a partir de explantes de biopsia de piel tanto del paciente perteneciente a una familia con prionopatía familiar tipo GSS portador de la mutación Y218N en el gen *PRPN* como de los fibroblastos control de un individuo sano, se llevó a cabo por el grupo del Dr. Ángel Raya en el IBEC (Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona) mediante infección con retrovirus tal como han descrito previamente (Raya, Rodriguez-Piza et al. 2010). Una vez establecidas y caracterizadas las dos líneas de *hiPSC* se trabajó con las células congeladas a pase bajo (2 y 3) para su expansión y diferenciación neuronal (**Figura 14**).

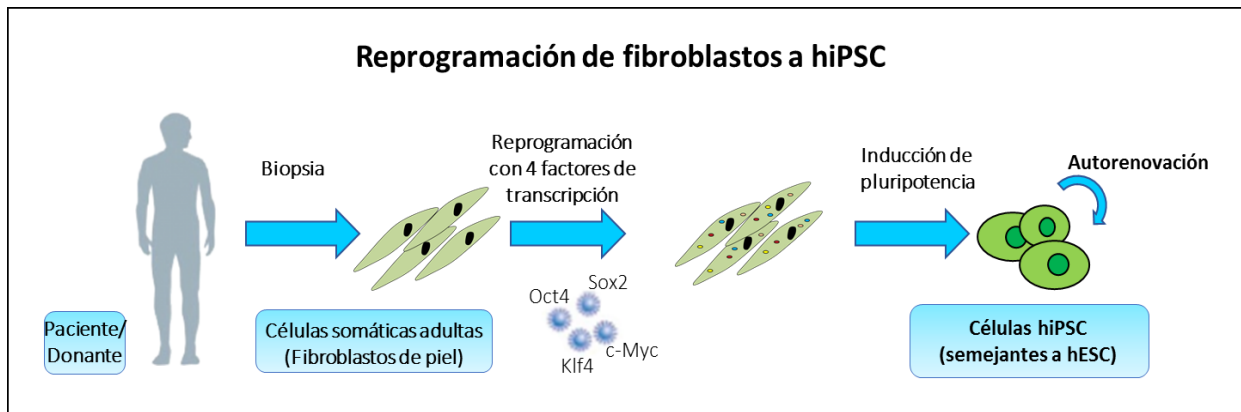


Figura 14. Representación esquemática de la reprogramación de fibroblastos control y portadores de la mutación Y218N a hiPSC.

Caracterización de las líneas de hiPSC

Las hiPSC seleccionadas de cada línea celular (control y paciente) se caracterizaron para probar la integridad y pluripotencia de las hiPSC. La caracterización fue realizada por el grupo del Doctor Ángel Raya utilizando las técnicas habituales. Las pruebas realizadas consistieron en: Cuantificación del silenciamiento de los transgenes, inducción de la expresión de genes endógenos de pluripotencia, expresión de marcadores de pluripotencia y actividad de la fosfatasa alcalina; análisis de la estabilidad cromosómica, desmetilación de los promotores de *OCT4* (*POU5F1*) y *NANOG*, así como, el análisis del potencial de diferenciación de las hiPSC *in vitro*.

Cultivo de hiPSC

Cultivo de hiPSC sobre feeders

Ambas líneas de hiPSC fueron cultivadas los primeros 8 pases sobre placas de 6 pocillos cubiertas con una capa de fibroblastos irradiados (*feeders*, HFF1 IRR) y mantenidos con medio hESC (*Knockout*-DMEM, suplementado con 20% de suero *Knockout Serum Replacement* (KSR,10828028-500mL, Invitrogen), NEAA, β -mercaptoetanol 0,1 mM (31350-20ml; Gibco), 0,5% de P / S, L-glutamax a 2 mM (35050038-100mL; Invitrogen), piruvato de sodio 1% (

11360-39-100Mm, 100ml, Gibco) y bFGF a 10 ng / ml (13256,Invitrogen). Las *hiPSC* fueron mantenidas sobre *feeders* a lo largo de 5-7 días hasta la formación de nuevas colonias. Las nuevas colonias fueron seleccionadas en base a su morfología, recortadas mecánicamente y cultivadas sobre nuevos HFF1-IRR (**Figura 15**). Se reemplazó el 75% del medio *hES* por medio fresco cada dos días.

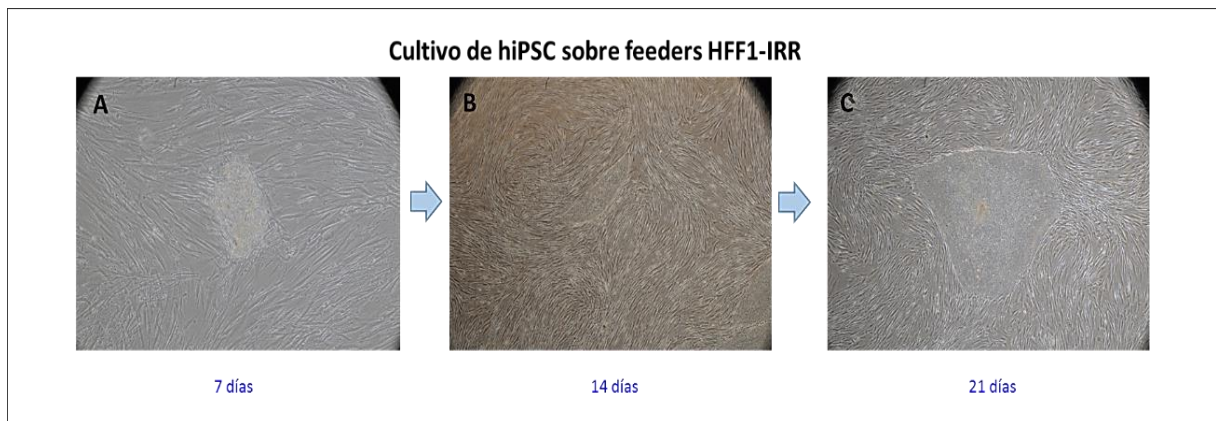


Figura 15. Morfología de *hiPSC* post- descongelación y cultivo sobre *feeders* HFF1 IRR para su mantenimiento y expansión. Morfología a los 7 días (A), 14 días (B) y 21 días (C). Se mantuvieron en medio *hESC* el cual reúne los factores y suplementos indispensables para las células embrionarias.

Cultivo de *hiPSC* sobre Matrigel

Una vez que fuimos capaces de propagar las *hiPSC* de forma estable sobre HFF1 IRR, se pasó a establecer los cultivos sobre una matriz libre de fibroblastos, utilizando para ello la matriz extracelular Matrigel (Matrigel® Matrix, 354248-5ml; Corning®, dilución 1:40) con medio condicionado *hESC* (durante 3 pases) y bFGF a 10 ng/ml. A continuación, se reemplazó el medio *hESC* por medio comercial mTeSR™ 1 hasta su selección para ser diferenciadas a neuronas corticales. Los medios empleados reproducen las condiciones embrionarias necesarias para mantener la pluripotencia y su reemplazo se realizó diariamente (**Figura 16**). Las *hiPSC* fueron propagadas mecánicamente o enzimáticamente con acutasa (SCR005-100ml;

Milipore).

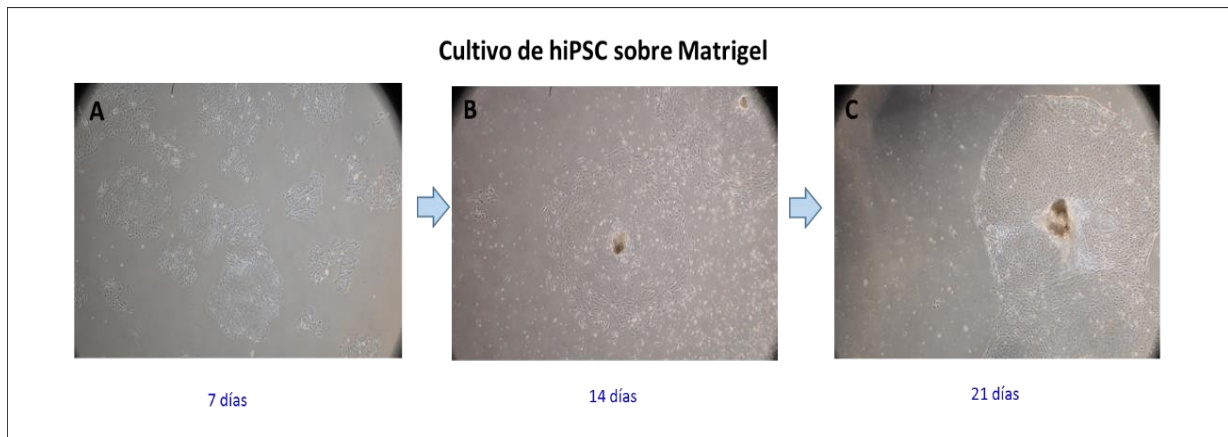


Figura 16. Morfología de *hiPSC* cultivadas sobre la matriz de Matrigel (Matrigel® Matrix, Corning®, dilución 1:40) para su mantenimiento y expansión. Morfología a los 7 días (A), 14 días (B) y 21 días (C). Se mantuvieron en medio condicionado de *hESC* (3 semanas) y posteriormente en medio comercial mTeSR™1 hasta su selección para ser diferenciadas a neuronas corticales.

Propagación de *hiPSC*

Propagación manual de *hiPSC*

La propagación manual (o mecánica) de las *hiPSC* se realizó recortando las colonias bajo control microscópico utilizando como escalpelo una aguja de 30G (jeringuillas de insulina 300015, MAC, SA) cada 5 o 6 días en el caso de las *hiPSC* mantenidas sobre *feeders* HFF1 IRR y cada 4 o 5 días en el caso de *hiPSC* en Matrigel. Se utilizó el inhibidor de la vía de señalización de Rho/Rho-cinasa (ROCK Y27632; Sigma Aldrich) durante 24 horas para mejorar la viabilidad celular.

Propagación enzimática de *hiPSC*

Para levantar las colonias de *hiPSC* o neuronas corticales mantenidas sobre Matrigel se utilizó la enzima acutasa y durante la siembra de las células se utilizó el inhibidor de ROCK Y27632 durante 24 horas en el medio celular específico de cada línea celular.

Diferenciación de *hiPSC* a neuronas corticales

Se realizaron 5 diferenciaciones a distintos tiempos tanto de las *hiPSC* control como de las portadoras de la mutación.

La diferenciación de las *hiPSC* se llevó a cabo siguiendo los protocolos publicados por el grupo de Vanderhaeghen (Vanderhaeghen 2012, Espuny-Camacho, Michelsen et al. 2013, Anderson and Vanderhaeghen 2014) con algunas modificaciones. (**Figura 17**).

Para iniciar la diferenciación neuronal, las *hiPSC* fueron recortadas mecánicamente (6 a 8 colonias) y sembradas sobre placas de seis pocillos tratada con Matrigel. A las 24 horas se reemplazó el medio comercial mTeSRTM 1 por medio fresco sin inhibidor de ROCK. Para el cambio de medio por el de inducción neuronal, se hizo una transición a lo largo de dos días, de forma que al cuarto día las células estaban con el cien por cien de medio de inducción neuronal (en inglés *Default Defined Medium* (medio DDM)). El día que se inició la inducción se consideró como día cero de la diferenciación (DIV 0) (Espuny-Camacho, Michelsen et al. 2013, Michelsen, Acosta-Verdugo et al. 2015), compuesto por Medio DMEM / F-12 alto en glucosa (31330095-500ml; Invitrogen) complementado con análogos sintéticos de inhibidores de las vías de diferenciación a mesoendodermo para favorecer la diferenciación hacia linaje neuronal; inhibidor de ALK, SB431542, 10 mM durante 4 días (1614-1mg; Tocris), inhibidor de BMP, LDN-193189, 100 nM (130-096-226-2mg; Miltenyi Biotech) durante 12 días y los suplementos N2 1X (17502048-100x; Gibco), B27 sin vitamina A 1X (12587-010, 50X10ml; Gibco), aminoácidos no esenciales, 2-β-mercaptoetanol 50 Mm (21985-25 ml; Gibco) y glutamax 2 mM. Las células se mantuvieron en este medio por un plazo de 24 días.

Durante este periodo fueron seleccionadas, recortadas mecánicamente y expandidas (1:2) sobre nuevos pocillos previamente tratados con Matrigel (plaqueo cada 5 a 7 días) con la

finalidad de eliminar cualquier área con morfología no neuroepitelial. Hacia los días 20 -24 de inducción neuronal, se observó el desarrollo de rosetas neuroepiteliales las cuales se pasaron de forma manual sobre nuevas placas de 6 pocillos tratadas con gelatina 0,1%, poli-L-lisina (35420, 33.3 mg/ml; BD) y laminina (354232-3.3 mg/ml; BD). A partir del día 24 de diferenciación, el medio DDM fue reemplazado gradualmente a lo largo de dos días a medio de diferenciación neuronal (Medio N2B27) de forma que al segundo día las células estaban con el cien por ciento de medio de diferenciación neuronal (medio N2B27) (Espuny-Camacho, Michelsen et al. 2013, Michelsen, Acosta-Verdugo et al. 2015), consistente en Medio Neurobasal (21103-049-500mL; Gibco) con suplemento N2 1X, suplemento B27 1X sin vitamina A y glutamax 2 mM. Desde éste momento de la diferenciación las neuronas fueron pasadas enzimáticamente mediante la solución de acutasa junto con el inhibidor de ROCK (durante 24 h) a nuevas placas de 6 pocillos previamente tratadas con poli-lisina/laminina. El medio fue reemplazado cada dos días hasta el día 140 de diferenciación neuronal, a partir de entonces el medio se reemplazó cada 4 días. Para estudios de IF, las neuronas se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm en placas de 24 pocillos previamente tratadas con poli-lisina/laminina y mantenidas en las condiciones de cultivo específicas hasta el día deseado de diferenciación.

Obtención de pellets celulares a lo largo de la diferenciación neuronal

Tanto en los ensayos de infectividad por priones como a lo largo de la diferenciación neuronal recogimos pellets celulares (sedimentos) mediante centrifugación a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C, a distintos tiempos y almacenados a -80°C con la finalidad de extraer ARN o proteína total para su posterior análisis. En el caso de las neuronas basales (no inoculadas) la

obtención de pellets se realizó cada 15 días y en las neuronas inoculadas cada vez que se realizaba un plaqueo sobre nuevas placas.

ENSAYOS DE INFECTIVIDAD CON PRIONES

Primero se llevó a cabo una selección minuciosa de los cerebros procedentes de dos fuentes: 1) de pacientes humanos que habían desarrollado GSS, *ECJ* o IFF tomando en cuenta su historial clínico con presencia de lesiones características causadas por priones. 2) encéfalo de mamífero infectado con la cepa de *scrapie* adaptada a Hámster (263K-Hamster), que utilizamos como control de la eliminación del inóculo de partida ya que nos permite utilizar el mismo anticuerpo 3F4 (Tabla V). Como controles negativos se utilizaron cerebros de donantes sanos y neuronas no inoculadas.

Preparación de inóculos (homogeneizado de cerebro al 10%)

Los inóculos (*ECJ* 6.3, *ECJ* 8.2, GSS, IFF y *scrapie*) se prepararon frescos el día de la primera inoculación, y consistieron en un homogeneizado de encéfalo al 10% (p/v) en PBS 1X (100 ml, Gibco). El homogeneizado se pasó repetidas ocasiones por una jeringa 23-27G con la finalidad de obtener un sustrato homogéneo y a continuación se centrifugó a 12,000 *g* durante 5 minutos para eliminar detritus. Una alícuota se almacenó a -80° C para ser utilizada en una segunda inoculación celular tres días después de efectuada la primera (**Figura 18**).

Detección de los niveles de PrP^{Sc} presente en los inóculos.

Por razones de índole práctica, para el análisis de la señal de PrP^{res} presente en los inóculos, se procesaron muestras representativas de cada uno de los inóculos a utilizar, tal es el caso del inóculo de *scrapie*: encéfalo de hámster inoculado con la cepa 263K (prión de *scrapie* adaptado en hámster). *ECJ*: encéfalos humanos diagnosticados con *ECJ* de tipo

esporádico MM1 y GSS: encéfalo humano diagnosticado de GSS portador de la mutación Y218N. Las muestras de *scrapie* y *ECJ* se digirieron con 50 µg/ml de proteinasa K (PK) y se sometieron a un análisis bioquímico estándar. La muestra de GSS fue digerida con PK a 12,5 µg/ml ya que GSS suele presentar un patrón atípico (Pirisinu, Nonno et al. 2013) característico de la enfermedad. Esta cantidad de PK permite visualizar bien el patrón atípico del prión GSS Y218N.

Ensayos de infectividad en neuronas corticales.

- **Inoculación de neuronas corticales con homogeneizados de cerebros de pacientes con EETs (inóculos de PrP^{res})**

Las neuronas corticales control y mutadas fueron inoculadas a distintos días de diferenciación neuronal (DIV 30, 40, 60 y 80) con homogeneizados de encéfalo al 10% (p/v) (Tabla V). La forma de inoculación se realizó siguiendo el protocolo descrito por el grupo del doctor Groschup Oelschlegel y colaboradores (Oelschlegel, Geissen et al. 2015): Las neuronas corticales fueron sembradas 5 o 6 días previos a su inoculación sobre placas de 6 pocillos tratadas con poli-lisina/laminina hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia, tres cuartas partes del sobrenadante celular fue retirado y reemplazado con medio fresco N2B27 que contenía el homogeneizado de encéfalo al 10% (día 1 de inoculación). Tras un periodo de incubación de tres días, el 75% de sobrenadante fue reemplazado por medio N2B27 fresco, más otro 10% de homogeneizado de encéfalo (día 3 de inoculación). Dos días más tarde se añadió más medio fresco N2B27 (sin inóculo) al sobrenadante celular ya existente. Después de un período total de incubación de diez días con el inóculo de interés, el sobrenadante celular se retiró y el cultivo fue lavado en repetidas ocasiones con PBS 1X. Acto seguido se agregó medio fresco de cultivo N2B27 (**Figura 19**). Después de éste periodo de incubación con los inóculos, el medio N2B27 fue reemplazado

cada dos días hasta el día 140 de diferenciación neuronal, a partir de entonces el medio se reemplazó cada 4 días.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Extracción de proteína total

Para la extracción de la proteína total de las muestras, estas fueron digeridas con el tampón de lisis *RIPA* (Tabla VI) suplementado con una mezcla total de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Halt protease/phosphatase-1012796378441; Thermo). Los lisados resultantes fueron incubados durante 30 minutos en hielo agitándolos por vórtex cada 10 minutos, se sonicaron en el sonicador Misonix Q-700 (4000, 220 V-4000 MPX-010, sistema de micro placa, Q sónica LLC) con una potencia del 80 % y una energía de 250 W, con pulsos de 20 segundos de sonicación con 2 repeticiones y 5 minutos de incubación en frío entre cada una de las sonicaciones; se centrifugaron a 12.000 *g* durante 5 minutos a 4°C (Centrifuga de mesa 5415 D, Eppendor), y tras éste proceso el sobrenadante proteico fue transferido a un tubo limpio repitiendo la operación 3 veces. El lisado proteico fue guardado a -80°C hasta su análisis.

Cuantificación de proteína total

Para la cuantificación de la proteína total de los extractos se recurrió al método colorimétrico de BCA (ácido bicinconínico). La curva de BCA se preparó a partir de diluciones seriadas de albumina sérica bovina (ASB, A3912-100gr; Sigma) a 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 y 4 mg/ml junto con un sustrato compuesto por las soluciones A+B en proporción 50:1 respectivamente (BCATM Protein Assay Kit, JPG125020; Thermo Scientific,). En una placa de 96 pocillos se colocaron tres réplicas de cada dilución de la curva patrón, así como de las muestras a cuantificar con el sustrato y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. La lectura de las

muestras se llevó a cabo en el lector de placas colorimétrico Synergi HT (Biotek) a una longitud de onda de 562 nm.

Análisis de expresión de PrP^C en neuronas derivadas de *hiPSC*

Con la finalidad de analizar los niveles de expresión de PrP^C mediante la técnica de *WB* en neuronas basales (no inoculadas) control y mutadas se utilizaron extractos proteicos procedentes de pellets celulares que fueron extraídos cada 15 días por un periodo de 6 meses y en algunos casos hasta los 7 meses.

Estudio de resistencia de la PrP^C a la digestión con proteinasa K (PK) en neuronas corticales basales

La resistencia a PK, característica de la proteína PrP infecciosa, se evaluó en los cultivos neuronales, incubando las muestras con proteinasa K (PK) durante 30 min a 37°C con una agitación constante de 450 rpm (Thermomixer confort, Eppendorf). Seguidamente se sonicó durante 8 x 30s (Sonicador Misonix Q-700, sistema de microplaca, Qsonica). Las concentraciones de PK (Roche) empleadas se adaptaron a la concentración de PrP^C expresada en las neuronas corticales. La concentración de PK final fue de 2,5 µg / ml y 2% de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2% de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) como detergente. La digestión se detuvo mediante la adición de solución tampón de carga *NuPAGE* LDS 4X (NP0008, Invitrogen Life Technologies).

Detección de proteínas mediante la técnica de *Western blot*

- **Preparación de muestras proteicas**

Una vez cuantificada la proteína de las muestras (control y mutadas), se prepararon para ser resueltas por electroforesis. La muestra proteica se normalizó a una concentración de 30 ug totales y se añadió el tampón de carga. El pellet junto con el tampón de carga se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, a continuación, el pellet se resuspendió suavemente con la ayuda de una pipeta y fue incubado durante 5 min a 100 °C (Dry bath incubator, Fisher Scientific) para su posterior carga.

- **Electroforesis y transferencia a membrana**

La resolución de las proteínas se realizó en geles comerciales Criterion (TGX gel 4-15% Bio-Rad) a un voltaje constante (80 voltios) hasta su completa resolución.

La transferencia se realizó a 850 mA para la detección de las proteínas PrP^C y *GAPDH*; mientras que para el resto de proteínas neuronales se realizó a una intensidad constante de 350mA durante 1 h, a 4°C (Tabla VII). Del mismo modo, el sistema de transferencia se adaptó al sistema de electroforesis empleado, seleccionando membranas adsorbentes de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF, Bio-Rad) y electrotransferencia con el equipo *Trans Blot Turbo System* (Bio-Rad) para las proteínas transferidas a 850 mA y membranas de nitrocelulosa (Protran BA85, GE Healthcare) y electrotransferencia con el equipo *Trans-blot Cell* (Bio-Rad) para las proteínas transferidas a 350 mA. Se utilizó un marcador pre-teñido con un rango de peso molecular de 15 kDa a 175 kDa (MAP02-500 ul; Biorad).

- **Incubación de membranas con anticuerpos primarios y secundarios**

Previamente a la incubación con los anticuerpos, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con leche desnatada al 5% (p/v) en tampón de lavado PBS 1X + Tween-20 al 0,5% (PBST) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Tras el bloqueo de la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla VIII) diluido en PBST con 1% de leche desnatada, a 4°C por 16 horas (ON). Al día siguiente se realizaron 3 lavados en PBST y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con HRP correspondiente (Tabla VIII) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras cada incubación se realizaron lavados con PBST.

- **Detección y visualización por imagen de bandas inmunoreactivas**

Por último, la detección de las bandas proteicas inmunoreactivas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el Kit *Super Signal West Pico* (Thermo Scientific Pierce) y la visualización de imágenes mediante el equipo *FluorChem Q* (Alpha Innotech) y el Software AlphaView (Alpha Innotech).

Extracción de ARN total

La extracción de ARN total tanto en *hiPSC* como en las neuronas corticales, se llevó a cabo empleando el protocolo de extracción basado en el disolvente orgánico Quiazol (QIAzol Lysis Reagent, 79306-100 ml, QUIAGEN) mientras que la purificación del ARN se realizó utilizando el kit comercial RNeasy mini (RNeasy mini, 50- 74104; QUIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad de ARN total presente en las muestras se determinó mediante un espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific) a través de la medida de absorbancia a 260 nm.

RT-PCR cuantitativa

El ARN total extraído de las *hiPSC* y neuronas corticales se transcribió a ADN complementario (ADNc) utilizando el kit comercial High-Capacity ADNc Reverse Transcription (4368814, Life Technology) con inhibidor de ARNsas y el uso de las sondas (oligos) aleatorios. La retro transcripción (RT) se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-rad). Las condiciones empleadas para el desarrollo de la RT fueron 10 minutos a 25°C, dos ciclos de 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente mantenidos a 4°C. Aproximadamente 30 ng de ARN total fueron retro-transcritos a ADNc.

Una vez obtenido el ADNc, se realizó el análisis cuantitativo de la expresión génica de distintos genes tanto de pluripotencia en el caso de las *hiPSC*, como de tipo neuronal (maduración temprana, intermedia o tardía) y constitutivo, por medio de PCR cuantitativa en tiempo real en placa. La amplificación génica se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 1 mM de cada cebador, el Master Mix PCR SYBR® Green (436.870, Applied Biosystems) y 10 ng de ADNc. Para llevar a cabo la RT se utilizó el sistema de detección Step One Software v2.1 y StepOne Plus Real Time PCR Detection System (Applied Biosystems). Las condiciones empleadas para el desarrollo de la RT fueron: Cuarenta ciclos de PCR con un perfil de temperatura de 95°C durante 30 s y un T_m de 60°C durante 1 min. Finalmente, las señales fluorescentes de los productos de la PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés *real time quantitative PCR*, *qPCR*) se normalizaron respecto al gen *GAPDH* y la expresión génica de cada producto se calculó por el método $2^{-\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). Se realizaron triplicados de cada muestra. Las sondas (oligos) utilizados se enumeran en la Tabla IX. Las barras encontradas en las gráficas representan la media de 2 a 4 puntos de tiempo para cada etapa y el error estándar (del inglés *standard error of the mean*, *SEM*) analizados en 2 o más

diferenciaciones independientes.

Inmunofluorescencia y microscopia confocal

Inmunofluorescencia (IF)

Se examinó la expresión y distribución de distintas proteínas neuronales tanto en neuronas control como portadoras de la mutación Y218N en estadios de maduración temprano, intermedio y tardío por medio de IF siguiendo el protocolo descrito por Sonntag y colaboradores (Sonntag, Pruszek et al. 2007). Las células cultivadas sobre cubreobjetos de cristal fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) (15710-S; Electron Ciencias Microscopía) al 4% en PBS 1X durante 20 min a TA, se bloquearon y permeabilizaron usando 10% de suero de burro (del inglés, *donkey serum*, *DS*) (017000121-10 ml; Jackson Immunoresearch) con 0,1% de Tritón-X en PBS 1X durante 45 min a TA. A continuación, los cubreobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo (PBS 1X + 10% *DS*) (Tabla VIII) durante la noche (16h) a 4°C. Después de tres lavados en PBS 1X con 10% de *DS*, los cubreobjetos se incubaron con anticuerpos secundarios Alexa Flúor marcados con un fluorocromo durante 1 h a TA (Tabla VIII.IV). Después de dos lavados con PBS 0,1x se añadió Hoechst (1:1000) (HOECHST 33258-12PQ060-100 mg; Sigma-Aldrich) y se incubó durante 2-3 min. Los cubreobjetos se montaron utilizando medio de montaje (Molecular Probes®, Life Technologies).

Microscopía confocal

Los experimentos de inmunfluorescencia fueron analizados utilizando un microscopio confocal (LSM 510-Meta, Carl Zeiss, Jena, Alemania) equipado con un diodo para detección de ultravioleta y tres líneas láser (488, 543 y 633 nm). Se obtuvieron imágenes confocales

sencillas, así como mosaicos (*tile scans*) para los recuentos y secciones ópticas (Z-stacks) para la reconstrucción ortogonal. El análisis se realizó con el software de Zeiss (Zen 2008 SP1.1) y con ImageJ 1.48v (<http://imagej.nih.gov/ij>). La cuantificación de células positivas para los marcadores seleccionados se expresó en % sobre el número de núcleos celulares marcados con Hoechst en cada sección ($n \geq 1.000$ células por condición) y la cuantificación de núcleos apoptóticos también se expresó en porcentaje sobre el total de núcleos celulares marcados con Hoechst ($n \geq 1.000$ células por condición).

Cuantificación de células positivas a proteínas para GFAP y DCX y de apoptosis celular.

La cuantificación sobre células positivas a proteínas, se realizó sobre imágenes de inmunofluorescencia con microscopía a 20x en células control y mutadas durante las tres etapas de maduración *in vitro*. El porcentaje fue expresado como % sobre Hoechst en una $n \geq 1000$ células. Para evaluar las diferencias ocasionadas por el fenotipo y el estadio de maduración utilizamos ANOVA de 2 vías y prueba de Bonferroni; los asteriscos indican la significancia estadística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La cuantificación de la apoptosis celular en cultivos, se realizó sobre imágenes de inmunofluorescencia con microscopía confocal obtenidas a 20x en células control y mutadas durante las tres etapas de maduración *in vitro*. El porcentaje fue expresado como % sobre el total de Hoechst en una $n \geq 1000$ células por condición. Los resultados se analizaron mediante ANOVA de 2 vías y prueba de Bonferroni; los asteriscos indican la significancia estadística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Transformación y análisis de datos

El análisis estadístico y las gráficas se generaron usando el Software Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Los valores se analizaron por medio de la prueba ANOVA de dos vías (genotipo y tiempo), con análisis *post-hoc* de Bonferroni; se estableció el nivel de significancia (* en $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Los datos expresados en gráficos en columnas representan la media y el error estándar (*SEM*).

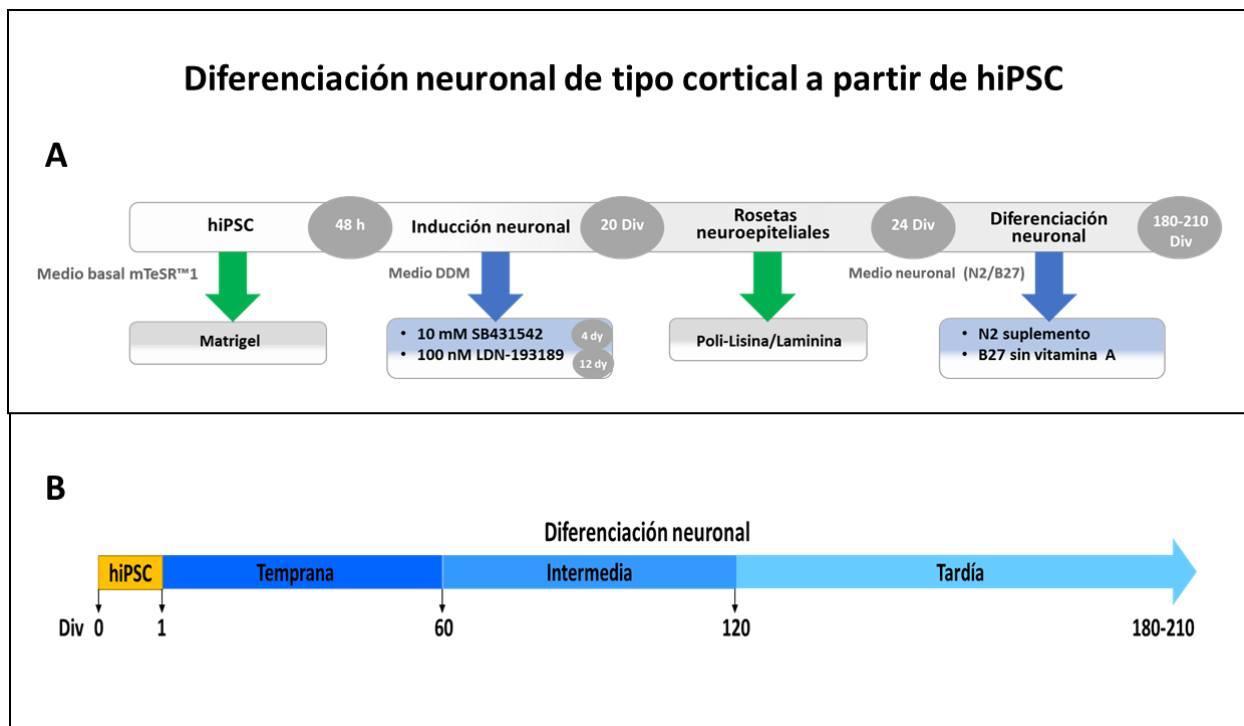


Figura 17. Representación esquemática de las etapas de diferenciación neuronal de tipo cortical a partir de *hiPSC* control y portadoras de la mutación Y218N.

Las *hiPSC* fueron diferenciadas y analizadas a distintos estadios de maduración neuronal (etapa de maduración temprana → progenitores y neuroblastos. Etapa de maduración intermedia → neuroblastos y neuronas jóvenes. Etapa de maduración tardía → neuronas maduras).

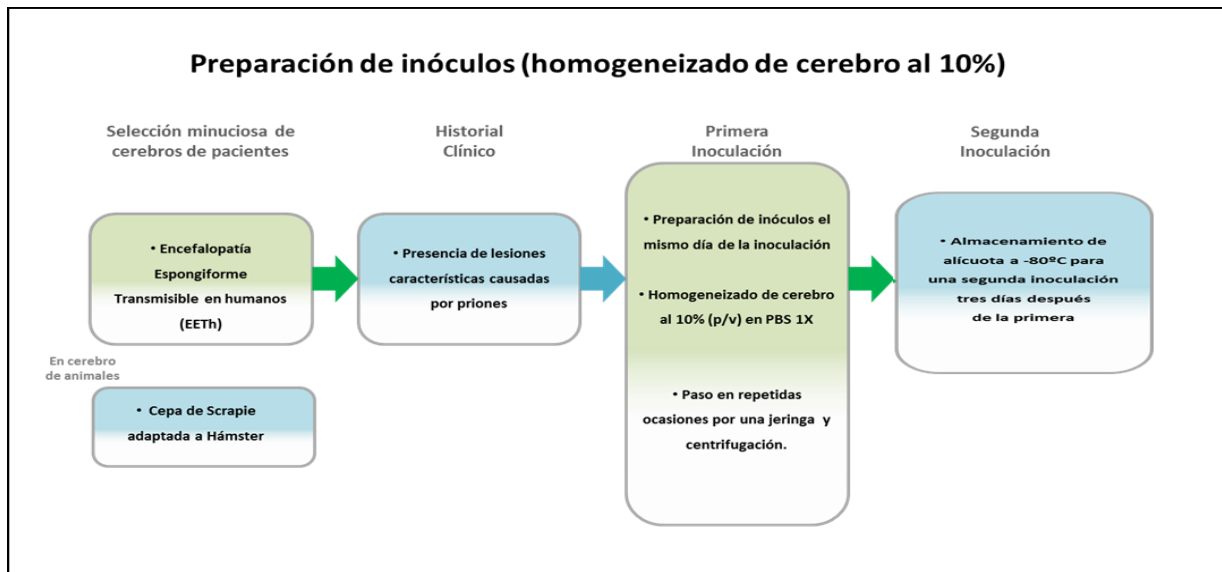


Figura 18. Representación esquemática de las etapas de preparación de los inóculos. Homogeneizados de encéfalo para ser utilizados para el ensayo de infección con priones.

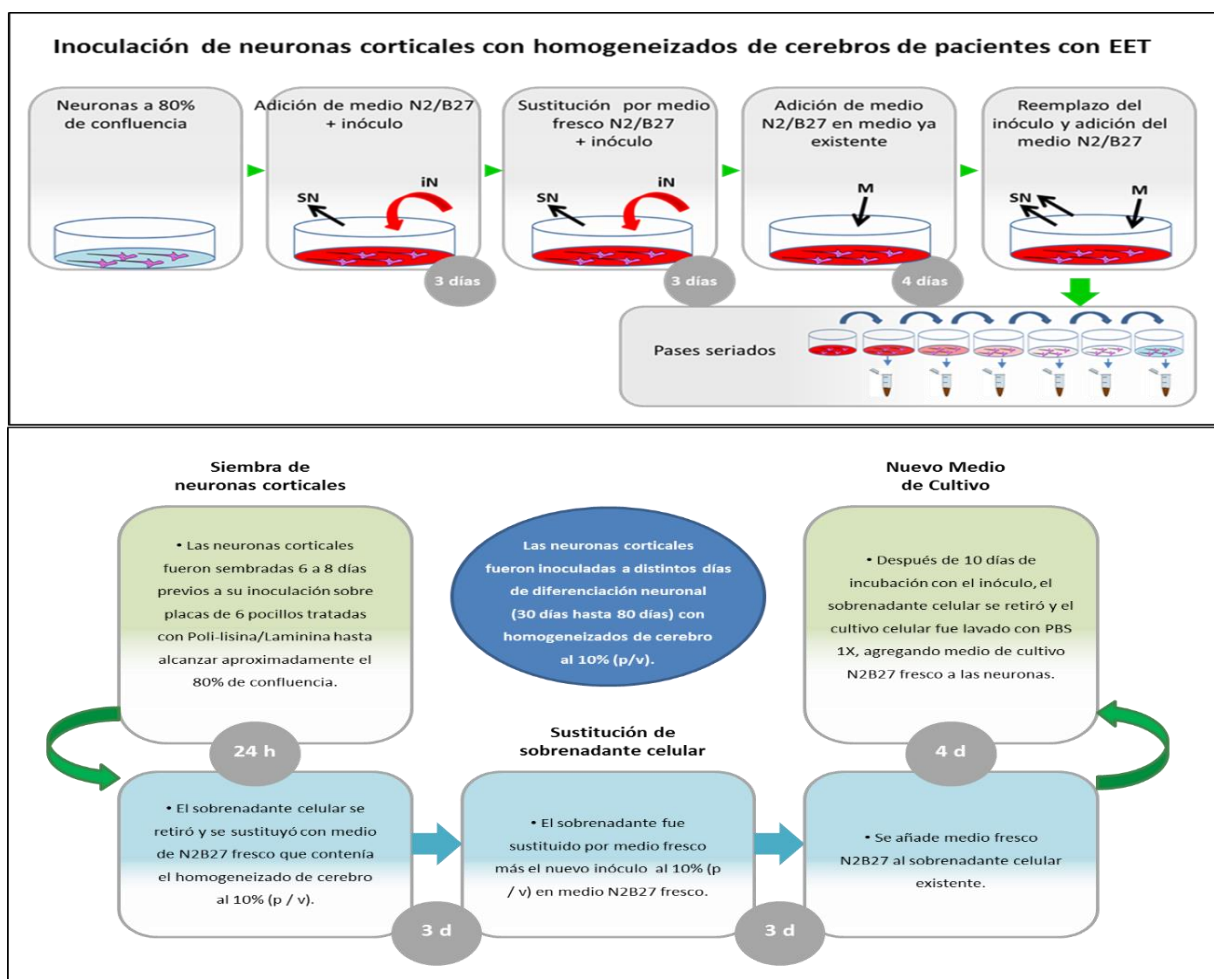


Figura 19. Representación esquemática de las etapas de inoculación con distintos tipos de inóculos. Homogeneizado de encéfalo procedente de pacientes que habían desarrollado una EET (GSS, IFF, ECJ y scrapie).

RESULTADOS

Basándonos en los conocimientos acerca de la replicación de priones a nivel celular y motivados por la falta de un modelo humano para estudiar la replicación de los mismos, el objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de un modelo válido de transmisibilidad de prionopatías humanas.

Para ello optamos por la utilización de neuronas derivadas de *hiPSC* y con el fin de aumentar las posibilidades de éxito, elegimos células pertenecientes a un paciente que presentaba la mutación Y218N en la *ORF* del gen *PRNP* (Alzualde, Indakoetxea et al. 2010). No se descartó la posibilidad de que la mutación pudiera dificultar el mal plegamiento requerido para la generación de formas resistentes a proteasas por lo que consideramos aplicaríamos otros criterios para evaluar el efecto de los inóculos.

Caracterización de las neuronas derivadas de *hiPSC* con la mutación Y218N

Derivación de neuronas telencefálicas a partir de *hiPSC*.

Las *hiPSC* reprogramadas a partir de fibroblastos portadores de la mutación Y218N y fibroblastos control fueron generadas por el equipo de reprogramación del Dr. Ángel Raya en Barcelona. Obtuvimos *hiPSC* a pase bajo de su laboratorio, pase 2 en el caso de las *hiPSC*-Y218N y pase 3 en la *hiPSC*-control. Estas células pluripotentes fueron mantenidas en condiciones de pluripotencia sobre *feeders* y adaptadas a matrigel. Tras varios pases (10 pases en las *hiPSC*-Y218N y 11 en las *hiPSC*-control) se analizó la expresión a nivel transcripcional de los genes que mostraban pluripotencia.

Tal y como muestra la **figura 20** tomada bajo microscopía de campo claro, las *hiPSC* tras varios pases presentaban una morfología típica formando colonias compactas y bien delimitadas de células indiferenciadas, siendo, por tanto, adecuadas para ser utilizadas en la

diferenciación neuronal. A nivel macroscópico los cultivos celulares de las *hiPSC* control y mutadas no presentaron diferencias morfológicas y tampoco se encontraron diferencias reseñables en la proliferación y supervivencia a lo largo de los pases.

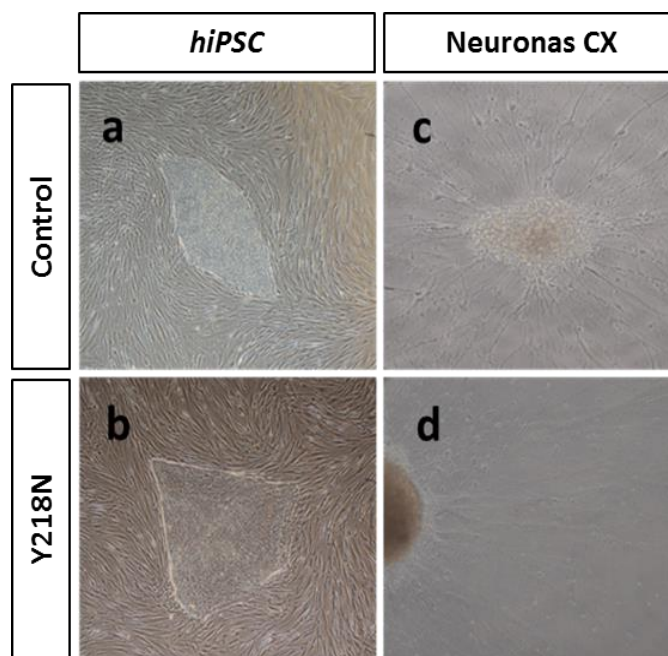


Figura 20. Diferenciación de *hiPSC* a neuronas telencefálicas. Representación en microscopía de campo claro de *hiPSC*-control y *hiPSC*-Y218N a día cero de diferenciación neuronal *in vitro* (a-b). Neuronas telencefálicas control (DIV 100) y Y218N (DIV 120) en etapa de maduración intermedia-tardía sobre monocapa de Poli-Lisina/Laminina (c-d).

Diferenciación de *hiPSC* a neuronas telencefálicas y caracterización a lo largo del tiempo.

La diferenciación de *hiPSC* a neuronas de tipo cortical telencefálico se llevó a cabo siguiendo los protocolos publicados por el grupo de Vanderhaeghen (Vanderhaeghen 2012, Espuny-Camacho, Michelsen et al. 2013, Anderson and Vanderhaeghen 2014) con algunas modificaciones, descritas detalladamente en la sección de material y métodos. Para corroborar la fiabilidad y reproducibilidad del proceso de diferenciación neuronal y los rasgos fenotípicos que podrían estar asociados a la presencia de la mutación en nuestras células, [control y mutadas (Y218N)] se realizaron 5 diferenciaciones independientes (control; n=5 y Y218N; n=5).

La inducción neuronal fue rápida y eficiente observando la presencia de progenitores neuronales a tan solo 4 días de haber iniciado dicha inducción y formación de rosetas neuroepiteliales a partir del día 8 viéndose incrementadas en número entre los días 20 y 24. La morfología neuronal fue consistente a lo largo de toda la diferenciación *in vitro* (**Figura 21A**).

Se analizó la expresión de marcadores neuronales típicos de progenitores neurales, neuroblastos y neuronas maduras a lo largo de la diferenciación neuronal (**Figura 21B**), observando mediante *WB* una transición apropiada en la expresión de los marcadores tempranos neuroepiteliales, como nestina (NES), hacia marcadores neuronales tempranos como beta III tubulina (TuJ1) y maduros, como NeuN y marcadores sinápticos, en etapas sucesivas. Teniendo en cuenta la secuencia temporal de aparición de dichos marcadores en nuestros cultivos definimos tres etapas: inicial, 0-60 DIV, media, 60-120 DIV y tardía >120 DIV (**Figura 21C**).

Estudiamos también la expresión temporal de marcadores neuronales telencefálicos durante la diferenciación *in vitro* mediante IF. En estos estudios se observó que, dos semanas después de la inducción neural, los cultivos neuronales estaban constituidos en su mayoría por progenitores neuronales caracterizados por la co-expresión de SOX2 y Nestina, con presencia de algunos neuroblastos (β III tubulina / TuJ1 positivo). A las 4 semanas se observó un incremento en la presencia de neuroblastos y de neuronas jóvenes, positivas para el factor de transcripción Pax6, expresado en todos los progenitores de telencéfalo dorsal, y siendo en su mayoría doblecortina-positivas (DCX). DCX es una proteína asociada a microtúbulos necesaria para la migración durante el desarrollo de la corteza, cuyas mutaciones causan liencefalia. Así mismo, la mayoría expresaban UBE3A, una ubiquitin-ligasa involucrada en la polarización de las dendritas durante el desarrollo embrionario, cuyas mutaciones están implicadas en autismo

(síndrome de Angelmann). A partir del tercer mes de diferenciación, las neuronas en cultivo expresaban NeuN (RBFOX3), un marcador neuronal post-mitótico y mantenían la expresión de DCX (**Figura 21D**).

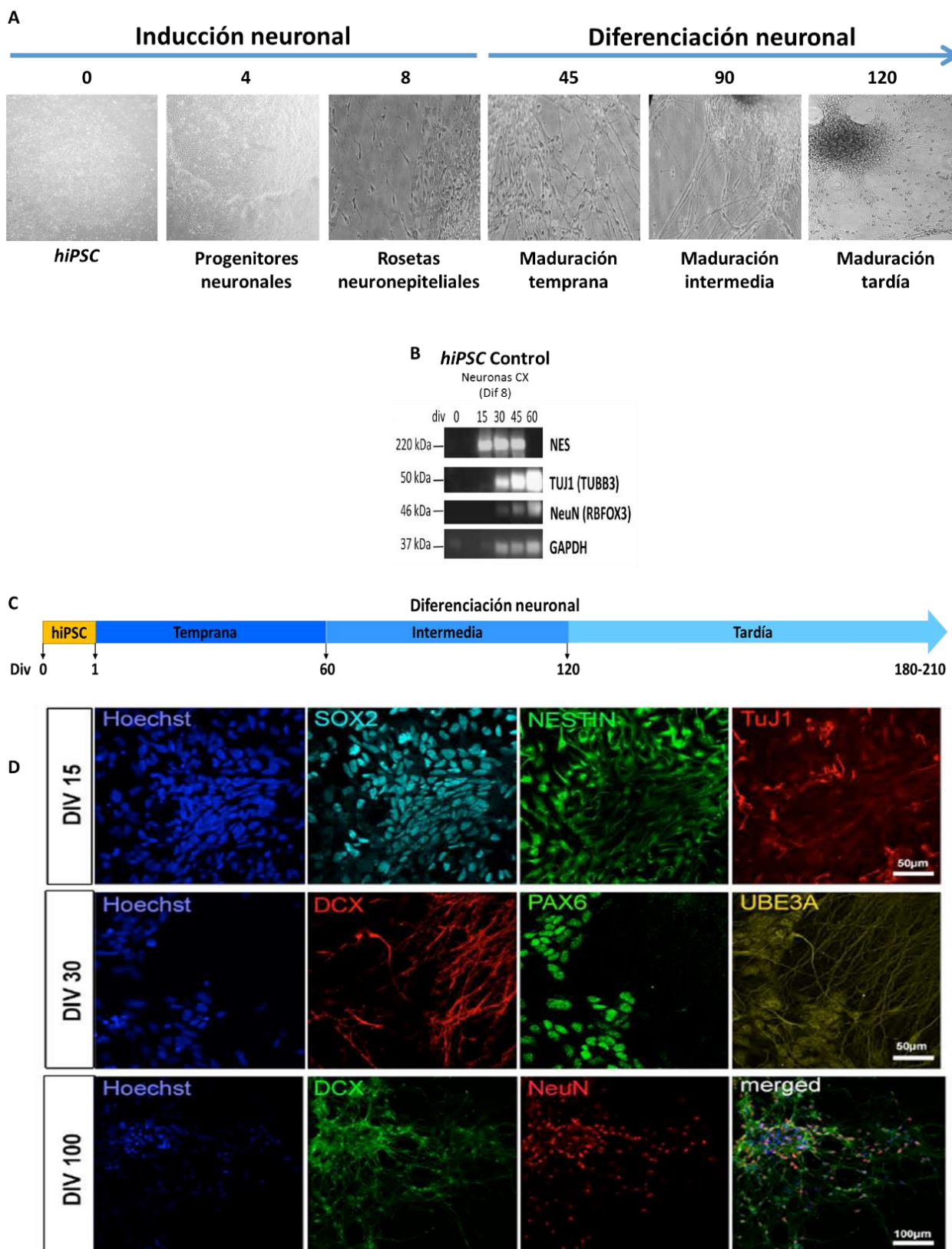


Figura 21. Caracterización de neuronas telencefálicas a través del tiempo. A) Representación fotográfica en microscopía de campo claro de la evolución morfológica presente en los cultivos celulares derivados a partir de *hiPSC*-control, a lo largo de la diferenciación telencefálica. DIV: días *in vitro*. B) Niveles de expresión de proteínas neuronales en extractos celulares de neuronas control y mutadas (DIV 0 hasta DIV 60) mediante el análisis de *WB*. Se demostró la expresión secuencial de las

proteínas de progenitores neuronales (NES), neuroblastos (TuJ1) y neuronas maduras (NeuN) en los cultivos a través del tiempo. GAPDH como control de carga. Anticuerpos primarios: Nestin, *TuJ1*, *NeuN* y GAPDH. DIV: días *in vitro*. C) Esquema representativo de las tres etapas de diferenciación (maduración) neuronal: inicial, 0-60 d DIV, media, 60-120 DIV y tardía >120 DIV. D) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la expresión secuencial de marcadores de células progenitoras neuronales a DIV 15 (SOX2, NES), a DIV 30 neuroblastos (TuJ1, PAX6, DCX, UBE3A) y de neuronas maduras (*NeuN*) en los cultivos celulares derivados a partir de neuronas control (DIV 100). Anticuerpos primarios: SOX2, NES, TuJ1, PAX6, NeuN y UBE3A. Microscopía confocal 40x a DIV 15 y DIV 30, 20x a DIV 100. Las barras de escala de 50 μm (DIV 15 y 30) y 100 μm (DIV 100).

Perfil transcripcional de neuronas telencefálicas.

Una vez establecido el protocolo de diferenciación de *hiPSC* a neuronas telencefálicas se realizó un examen del perfil transcripcional de marcadores de expresión génica regionales y de desarrollo [(progenitores neuronales (*PAX6*, *EMX1* y *FOXG1*) y neuroblastos (*NES*, *SOX2*, *TUJ1*)] en neuronas control y neuronas derivadas de *hiPSC* con la mutación Y218N en las tres etapas de maduración neuronal (inicial, media y tardía) mediante qPCR (**Figura 22**).

Los resultados obtenidos mediante q-PCR cuantitativa revelaron diferencias significativas en la última etapa de diferenciación neuronal con una disminución significativa en la expresión de los factores de transcripción del telencéfalo, *EMX1* (dorsal) y *FOXG1* (ventral), y una disminución progresiva de *TuJ1*, siendo en todos los casos la expresión significativamente menor en las células portadoras de la mutación Y218N.

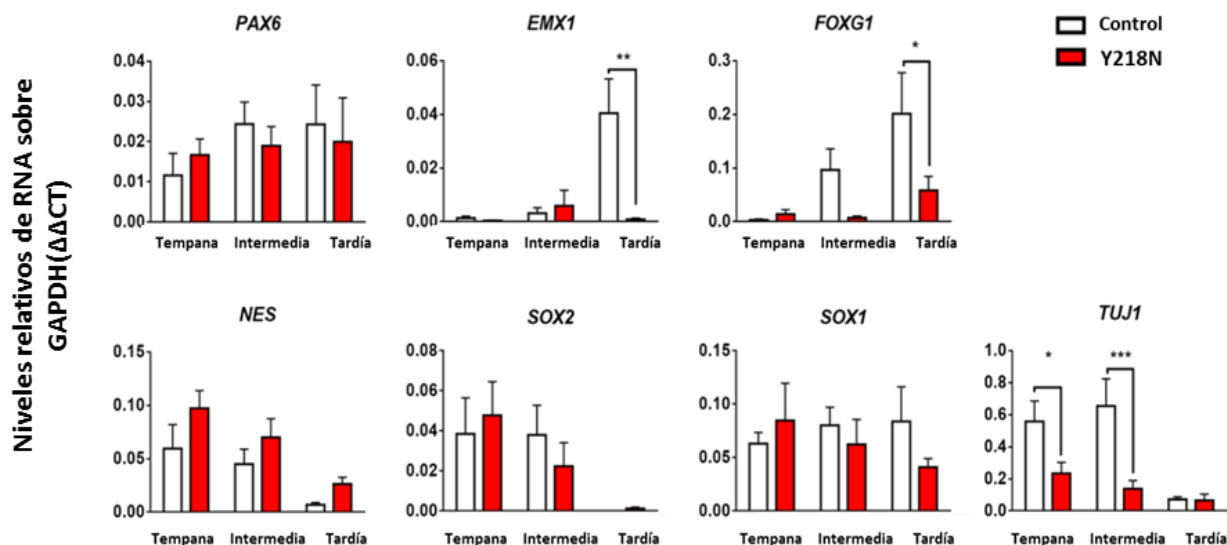


Figura 22. Perfil transcripcional en cultivos de células control y Y218N en las tres etapas de maduración neuronas. Análisis de la expresión de marcadores regionales y de desarrollo: progenitores neuronales (*PAX6*, *EMX1* y *FOXG1*), neuroblastos (*NES*, *SOX2*, *SOX2*, *TuJ1*) en las tres etapas de maduración *in vitro* mediante qPCR. Las barras representan la media y la SEM de 2-4 puntos de tiempo para cada una de las etapas de al menos 2 diferenciaciones independientes. Prueba estadística ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni. La concentración de ADnc fue normalizado sobre *GAPDH*. Los asteriscos indican la significancia estadística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Estudio de los niveles de expresión de PrP^C en neuronas telencefálicas

Dado que los niveles de PrP^C determinan el grado de propagación de la PrP^{Sc} tanto en cultivos celulares como en el cerebro, se estudiaron los niveles de expresión de PrP^C en los cultivos neuronales a distintos tiempos de diferenciación. Se analizaron las 5 diferenciaciones independientes tanto del control como de las neuronas mutadas. En el caso de las células control la diferenciación (DIF) 1, 2 y 3, hasta división (DIV) 90; DIF 5 y 6 hasta DIV 180 respectivamente. En el caso de las células Y218N: DIF 6 y DIF 7 hasta DIV 150 y 180 respectivamente, mientras que DIF 9, 10 y 11 hasta DIV 135, 120 y 120, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante WB (**Figura 23**), indicaron que la expresión de PrP^C en neuronas derivadas de *hiPSC* tanto del control como las mutadas (Y218N) aumentaba progresivamente a lo largo del tiempo, siendo detectable en algunos casos a partir del día 15 y

de forma consistente a partir del día 30. La expresión aumentaba hasta estadios tardíos de diferenciación (DIV 180), y en algunos casos hasta DIV 210 (DIF 5). No se observaron diferencias significativas en la expresión de PrP^C entre las células control y las células que portaban la mutación. No se descarta que en tiempos tardíos la expresión de PrP^C pareciera ligeramente mayor en las células control, probablemente por la presencia de un mayor número de neuronas en los cultivos. Esta observación se debe a que en los cultivos de neuronas portadoras de la mutación Y218N se observó una disminución de todos los marcadores neuronales a los tiempos más avanzados (ver página 133).

La expresión consistente de PrP^C tanto en las neuronas control como en las portadoras de la mutación del paciente nos permite confirmar su utilidad como modelo adecuado en ensayos de propagación de priones humanos *in vitro*.

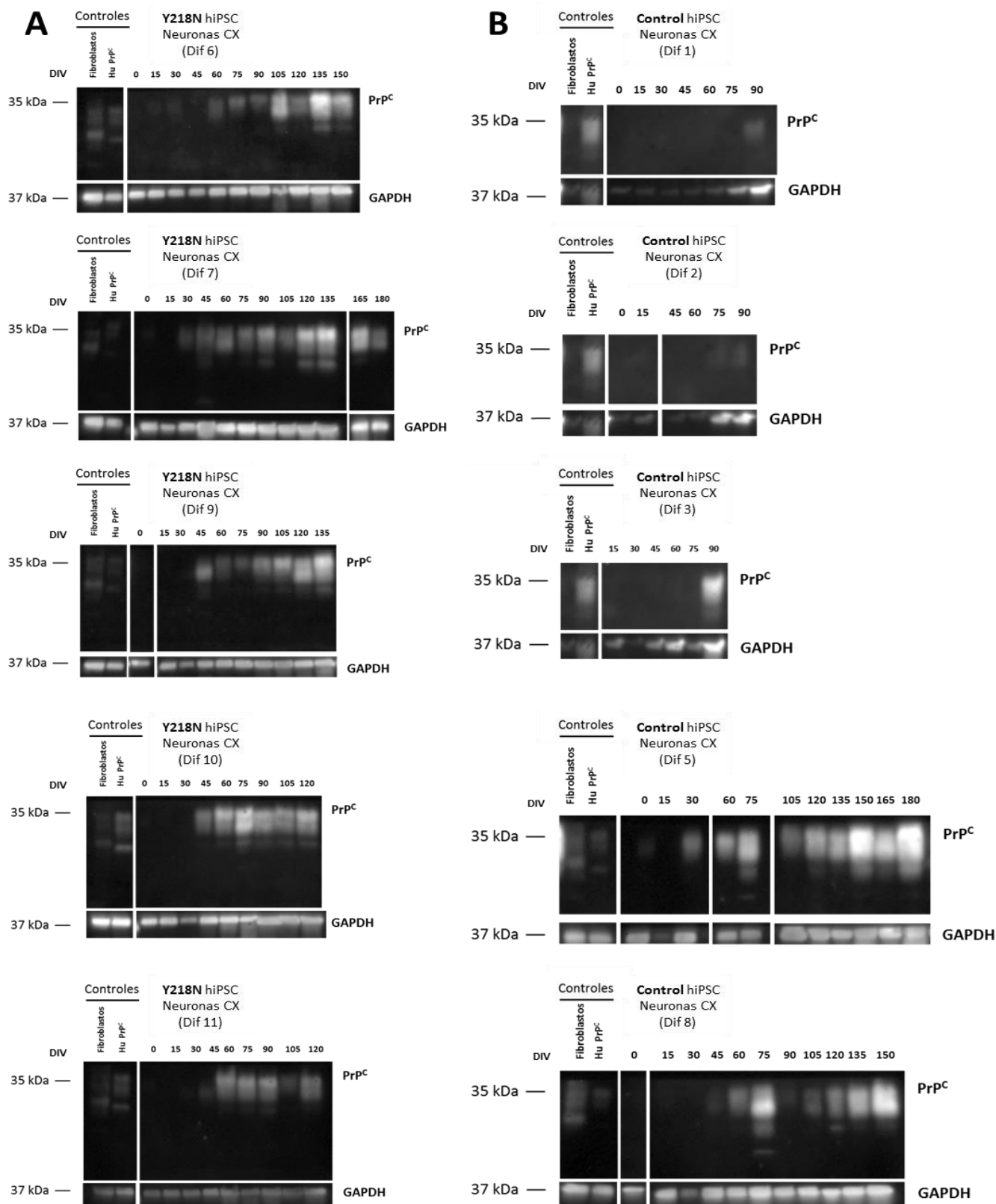


Figura 23. Análisis de expresión de PrP^C en neuronas derivadas a partir de *hiPSC*-control y mutadas (Y218N) a través del tiempo. A-B). Análisis de expresión de PrP^C en los extractos celulares derivados de *hiPSC*-control y mutadas mediante *WB*, en las 5 diferenciaciones de cada genotipo. Se observa un incremento en la expresión de PrP^C a lo largo de la diferenciación neuronal. Las muestras celulares fueron tomadas cada 15 días hasta el final de cada diferenciación entre el día 90 y 180. En el caso de las células control: DIF 1, 2 y 3, hasta DIV 90; DIF 5 y 8, hasta DIV 180 y 150 respectivamente,

respectivamente. En el caso de las células Y218N: DIF 6 hasta DIV 150: DIF 7 hasta 180; mientras que DIF 9, 10 y 11, hasta DIV 135, 120 y 120, respectivamente. *hiPSC*-control y mutadas a DIV 0, como control negativo a la diferenciación neuronal y a la expresión de PrP^C. Encéfalo de donante sano como control positivo a la expresión de PrP^C. GAPDH como control de carga. Hu PrP^C: extracto de cerebro de humano sano. DIF: diferenciación celular. DIV: días *in vitro*.

Análisis de PrP^{res}

Con el objetivo de examinar la potencial generación de PrP^{res} a lo largo de la diferenciación neuronal en los cultivos celulares, se analizaron las 5 diferenciaciones independientes de las neuronas mutadas (diferenciación 6, 7, 9, 10 y 11) y dos diferenciaciones de las neuronas control (diferenciación 5 y 8). Las muestras se digirieron con la mínima cantidad posible de proteasa que permitía la eliminación completa de PrP^C en células control (dato no mostrado). Por ello, los extractos celulares se digirieron con 2,5 µg/ml de PK observándose por WB (**Figura 24**) que las neuronas derivadas de *hiPSC* portadoras de la mutación no generaban formas resistentes a lo largo de la diferenciación de forma espontánea. Como era de esperar en las neuronas control tampoco se observó resistencia a PK a lo largo de la maduración *in vitro* en el período de tiempo examinado (DIV 15 hasta DIV 165). Estos resultados sugieren que la mutación Y218N por sí sola no es un factor suficiente para la aparición de PrP^{res} *in vitro*.

La ausencia de formas PrP^{res} tanto en las neuronas control, como en las neuronas portadoras de la mutación Y218N del paciente en presencia de una robusta expresión de PrP^C permiten su uso en los estudios de propagación de priones (infección).

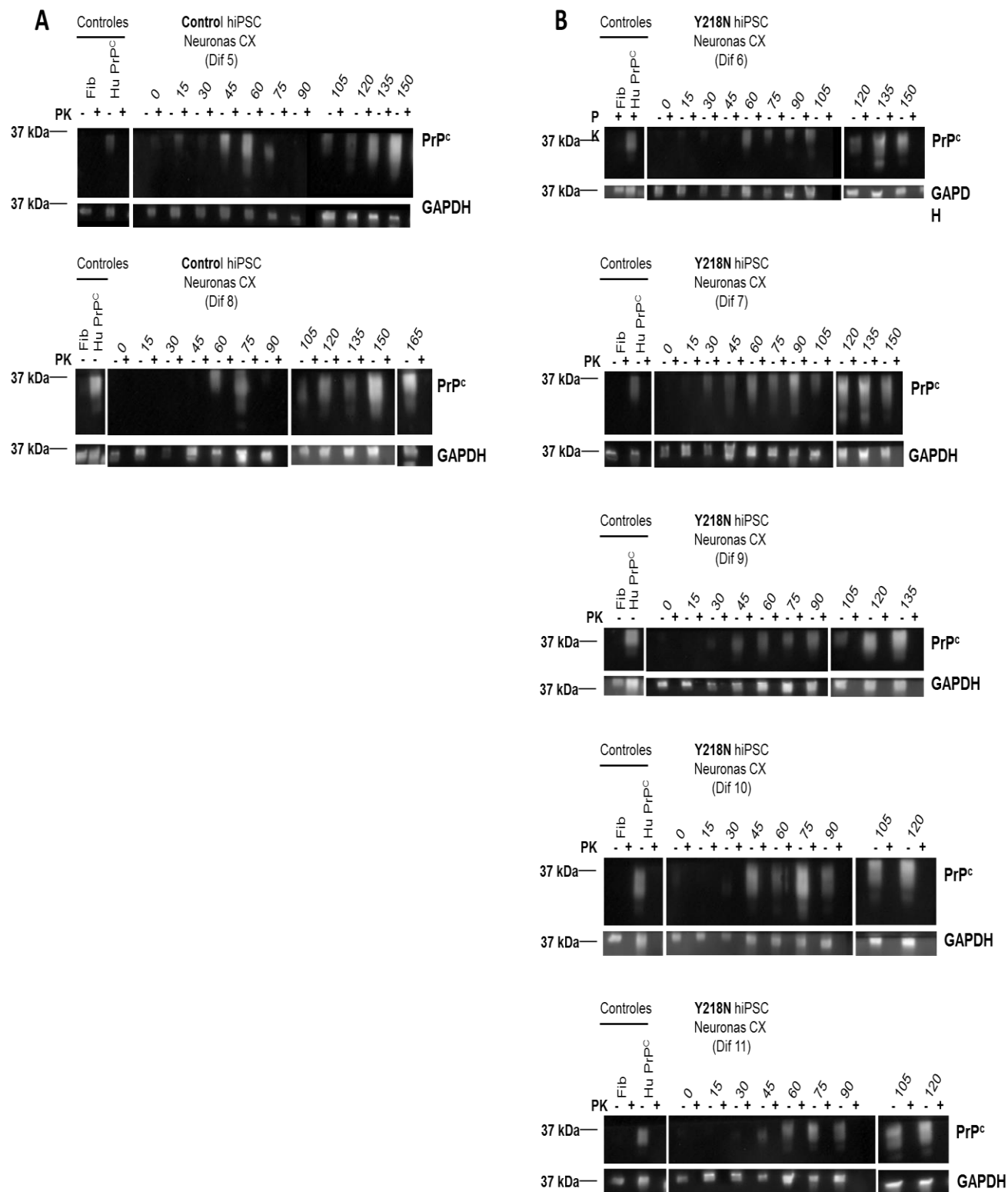


Figura 24. Estudio de resistencia a PK en extractos celulares de neuronas control y mutadas. A-B) La digestión de las muestra con PK no reveló ninguna forma resistente a PrP en los extractos celulares

derivados de *hiPSC*-control y mutadas mediante *WB*. Las muestras celulares fueron tomadas cada 15 días hasta el final de cada diferenciación entre el día 120 y 180. En el caso de las células control: DIF 5 y 8, hasta DIV 50 y 165, respectivamente. En el caso de las células Y218N: DIF 6 y DIF 7, hasta DIV 150; mientras que DIF 9, 10 y 11, hasta DIV 135, 120 y 120 respectivamente. *hiPSC*-control y mutadas a DIV 0, como control negativo a la diferenciación neuronal y a la expresión de PrP^C. Encéfalo de donante sano como control positivo a la expresión de PrP^C. Las muestras fueron digeridas con 2,5 µg/ml de PK. PK: proteinasa K. El símbolo +/- indican la presencia/ausencia de pretratamiento con PK. Anticuerpo monoclonal 3F4 para la detección de PrP. *GAPDH* como control de carga. DIV: Días *in vitro*. *hiPSC*: células madre humanas pluripotentes inducidas). *Cx dlff*: Diferenciación cortical.

ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL FENOTIPO ASOCIADO A LA MUTACION Y218N EN NEURONAS TELEENCEFÁLICAS.

Análisis de la expresión de *DCX* y *GFAP* a lo largo del tiempo

Al analizar el perfil transcripcional de *DCX* mediante qPCR, se observó un incremento no significativo en ambos grupos a lo largo del tiempo (* $p < 0,05$) (**Figura 25**).

Los niveles de expresión de *GFAP* en las células Y218N, estaban aumentados con respecto al control, sobre todo en etapas tardías de maduración *in vitro* (* $p < 0,05$) (**Figura 25**).

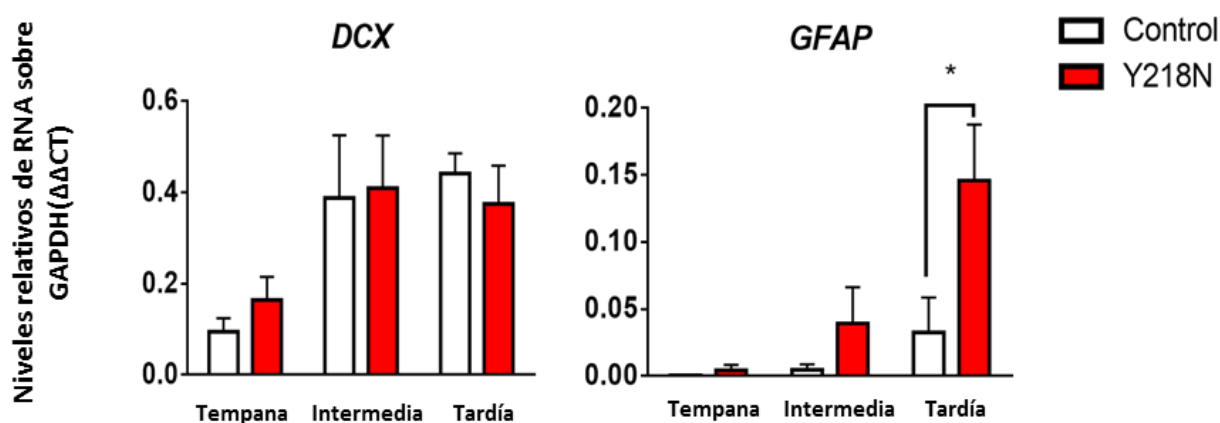


Figura 25. Perfil transcripcional de *DCX* y *GFAP* a lo largo del tiempo en neuronas telencefálicas en condiciones basal.

Análisis de la expresión de *DCX* y *GFAP* en las tres etapas de maduración *in vitro* mediante qPCR. La concentración de ADNc fue normalizado sobre la expresión relativa de *GAPDH*. Las barras representan la media y la SEM de 2-4 puntos de tiempo para cada una de las etapas de al menos 2 diferenciaciones

independientes. Prueba estadística ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni. Los asteriscos indican la significancia estadística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Con la finalidad de corroborar los niveles de expresión de DCX y GFAP observados en el perfil transcripcional, se realizó un análisis de la expresión de ambas proteínas mediante IF.

En el caso de las proteínas DCX y GFAP, se observó su expresión durante las tres etapas de maduración neuronal (**Figura 26A-B**), tanto en las células mutantes como las células control. La expresión de PrP^C se caracterizó con mayor detalle mediante *WB* (ver página 135). La gliosis fue mayor en las células mutadas que en las células control, comenzando a mostrar una morfología reactiva desde etapas más tempranas de maduración, presentando así una consonancia con el hallazgo de incremento de *GFAP* a nivel transcripcional. En el mismo sentido, las células Y218N GFAP-positivas presentaron rasgos morfológicos reactivos.

Debido a los hallazgos morfológicos observados en las células gliales, y de la expresión de DCX, se realizó una cuantificación de ambas proteínas mediante conteo de las células inmunoreactivas en los tres estadios de maduración neuronal. La cuantificación no mostró diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para DCX y GFAP (**Figura 26C**).

En la **figura 26D**, se muestra la morfología reactiva de las células Y218N GFAP-positivas, que sugiere que el aumento observado a nivel transcripcional se debe a una mayor expresión de GFAP por célula (glía reactiva).

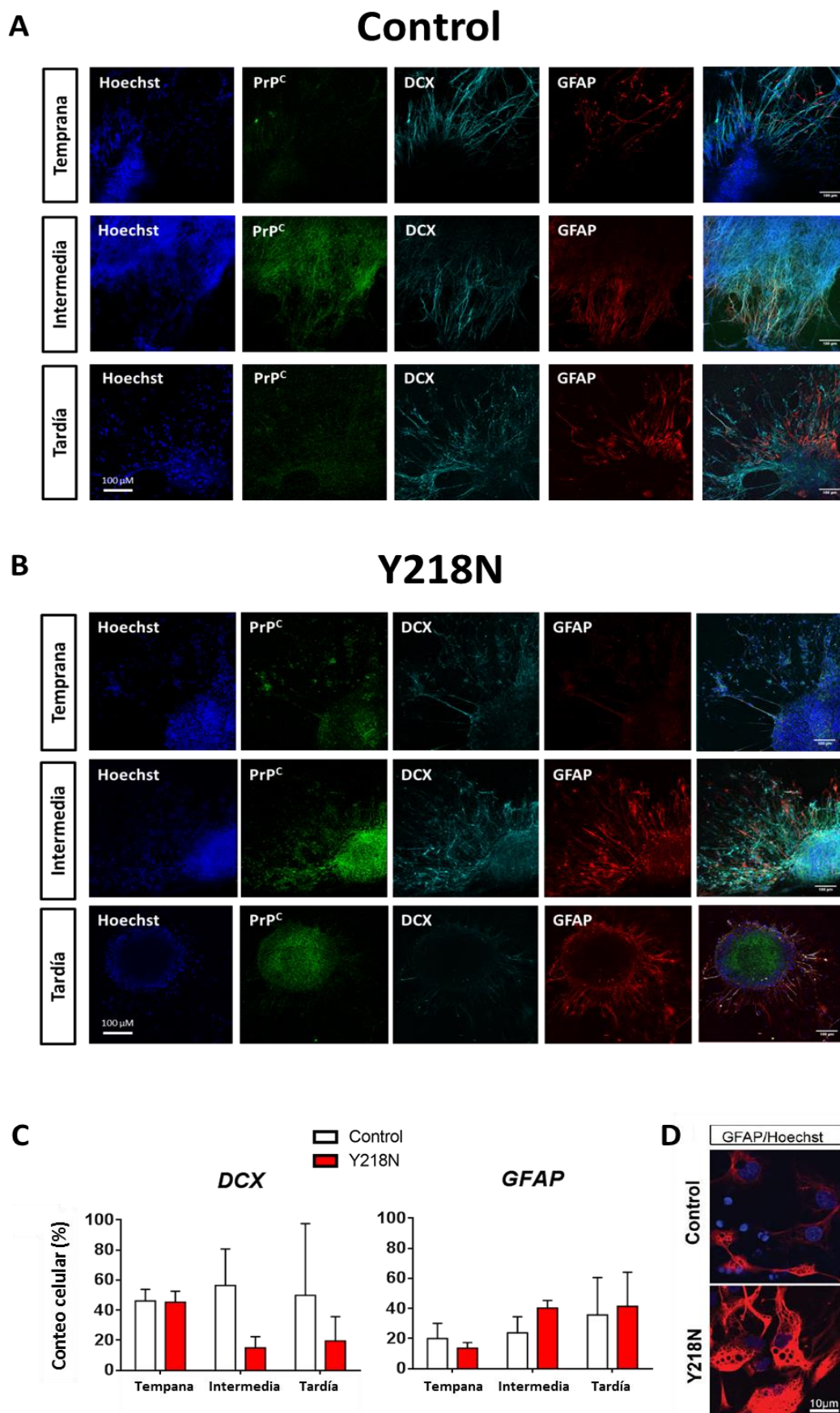


Figura 26. Caracterización de DCX y GFAP a lo largo del tiempo en neuronas telencefálicas en estado basal. A) Muestras micrográficas de inmunofluorescencia para la expresión de la proteína priónica

celular, DCX y GFAP durante las tres etapas de diferenciación neuronal en células control (DIV 45, 90 y 120). B) Muestras micrográficas de inmunofluorescencia para la expresión de la proteína priónica celular, DCX y GFAP durante las tres etapas de diferenciación neuronal en células Y218N (DIV 30, 115 y 160). Las células fueron fijadas e inmunoteñidas con anti-3F4/PrP^C, anti-DCX y anti-GFAP. Núcleos teñidos con Hoechst. Barras de escala: 100 μ m. C) Cuantificación de células positivas a GFAP y DCX en imágenes de inmunofluorescencia con microscopía confocal a 20x (tiles) durante las tres etapas de maduración *in vitro*. El porcentaje fue expresado como % sobre Hoechst en una $n \geq 1000$ células por condición. Prueba utilizada ANOVA de 2 vías y de Bonferroni; los asteriscos indican la significancia estadística (** $p < 0,01$). Barra de escala 25 μ m. D) Neuronas GFAP positivas. Las células fueron fijadas e inmunoteñidas con anti-GFAP. Núcleos teñidos con Hoechst. La imagen a gran escala representa la morfología reactiva de células positivas a GFAP durante la etapa intermedia de diferenciación. Barra de escala 10 μ m.

Durante la determinación del porcentaje de apoptosis, se encontró un aumento significativo en el porcentaje de núcleos apoptóticos en los cultivos de neuronas con la mutación Y218N, durante la etapa tardía de maduración (**Figura 27A**). La **figura 27B** muestra imágenes representativas utilizadas para la cuantificación de núcleos apoptóticos.

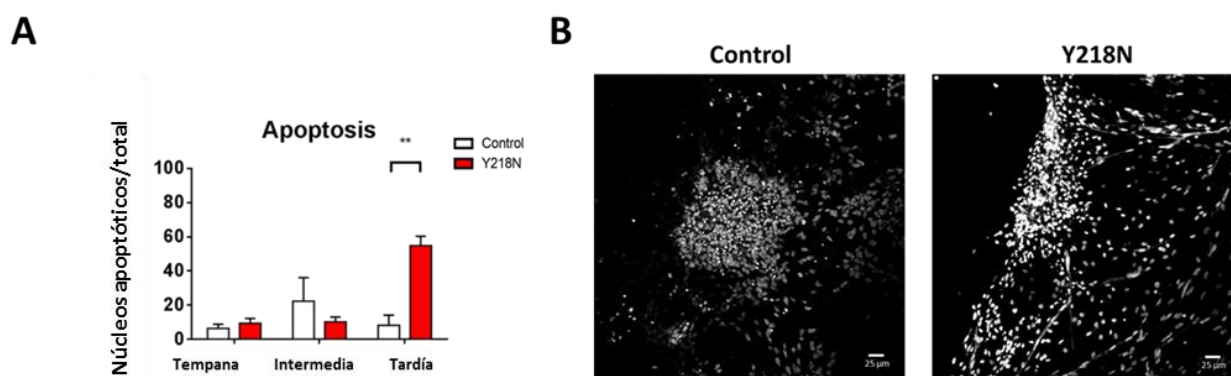


Figura 27. Apoptosis. A) Cuantificación de núcleos apoptóticos. Representación fotográfica de la apoptosis presente en los cultivos celulares (DIV 60). B) La cuantificación se realizó sobre imágenes de inmunofluorescencia con microscopía confocal a 20x en células control y mutadas a lo largo de la diferenciación telencefálica. Asteriscos indican la significancia estadística (** $p < 0,01$). El porcentaje fue expresado como % sobre el total de Hoechst en una $n \geq 1000$ células por condición. Prueba utilizada ANOVA de 2 vías y prueba de Bonferroni. Barra de escala 25 μ m.

Niveles de expresión de MAP2, VGLUT1 y MAPT a lo largo del tiempo

El análisis de los niveles transcripcionales de expresión de marcadores neuronales tales como *MAP2*, *MAPT*, *TuJ1* y sinápticos *VGLUT1*, en las tres etapas de maduración *in vitro* mediante qPCR, mostró diferencias significativas en la expresión de dichos genes en las células

Y218N. Estas diferencias fueron más acusadas en la última etapa de diferenciación neuronal, con excepción de calbindina (CB-d28k) que se vio muy disminuida desde etapas tempranas (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$) (**Figura 28A**), en neuronas mutadas.

Al estudiar la expresión de las proteínas MAP2 y VGLUT1 mediante IF en neuronas a día 80 de maduración *in vitro*, se observó que MAP2 se expresaba en mayor medida en las células control respecto a las mutadas, y además en las Y218N se observó un patrón distinto de localización subcelular. En el caso de VGLUT1 se observó una inmunoreactividad difusa y disminuida en las neuronas mutadas con respecto al control. Dichas observaciones están en concordancia con las alteraciones observadas en el perfil transcripcional (**Figura 28B**).

Dado que en los pacientes que portaban la mutación se han descrito cambios morfológicos de Tau fosforilada en el cerebro, analizamos de una forma más profunda la expresión de esta proteína en nuestros cultivos.

Mediante IF se observó que la proteína Tau en células Y218N a día 80 de diferenciación mostraban una mayor expresión de Tau respecto al control, con un patrón de depósito alterado a lo largo de las neuronas (**Figura 28C**). Este defecto también puede ser debido a una retracción de las neuritas, pero esto requeriría otro tipo de análisis que no hemos realizado.

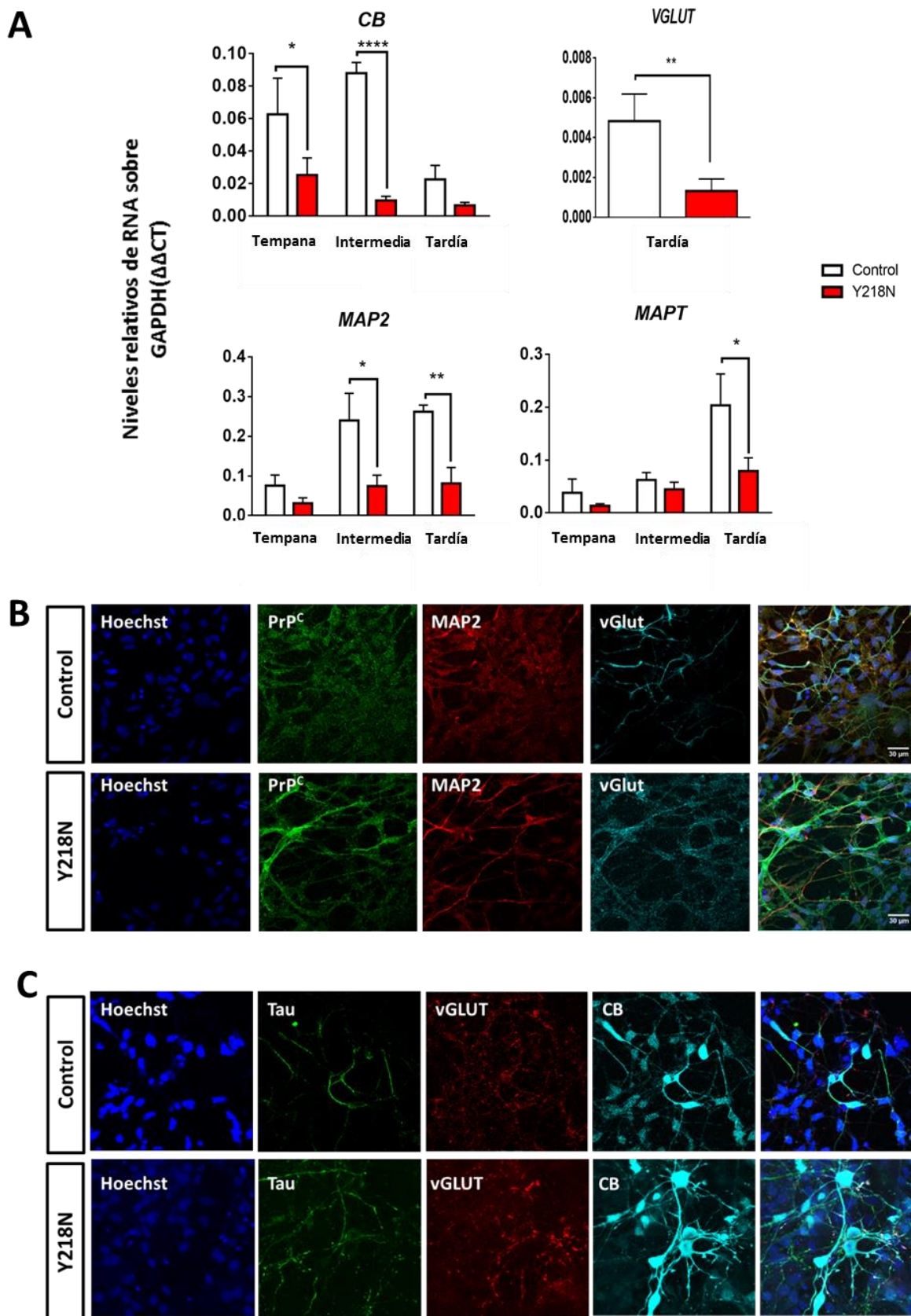


Figura 28. Expresión de MAP2, VGLUT1, Tau a lo largo del tiempo en neuronas telencefálicas en estado basal. A) Análisis de la expresión de marcadores neuronales de tipo constitutivo tales como

(MAP2, Tau y CB) así como de tipo sináptico (VGLUT1) en las tres etapas de maduración *in vitro* mediante qPCR. Las barras representan la media y la SEM de 2-4 puntos de tiempo para cada una de las etapas de al menos 2 diferenciaciones independientes. Prueba estadística ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni. La concentración de ADNc fue normalizada sobre la expresión relativa de GAPDH. Los asteriscos indican la significancia estadística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). B) IF en células control y mutadas para la detección de MAP2 y VGLUT1 a estadio intermedio de diferenciación neuronal (DIV 80). Las células de cada cultivo celular fueron fijadas e inmunoteñidas con anti-3F4-PrP^C, anti-MAP2 y anti-VGLUT1. Los núcleos teñidos con Hoechst. Microscopía confocal 20x. Barra de escala: 30 μm . C) IF en neuronas control y Y218N para la detección de VGLUT1 y Tau a estadio intermedio de diferenciación neuronal (DIV 80). Las células fueron fijadas e inmunoteñidas con anti-Tau y anti-VGLUT1. Los núcleos teñidos con Hoechst.

El análisis de estas neuronas en un estadio más temprano de diferenciación, mostró que la diferencia en los niveles de expresión de Tau se detectaba desde DIV 60 (**Figura 29A**).

Por otro lado, para analizar la forma fosforilada de Tau en distintas muestras procedentes de los cultivos mutados y control a distintos días de maduración *in vitro*, se estudió la expresión de Tau fosforilada en Ser 202/Thr 205, mediante el uso de un anticuerpo específico para su detección (AT8), el cual permitió documentar mayores niveles de expresión de Tau hiperfosforilada en las células mutadas respecto a las control y respecto al cerebro humano (**Figura 29B**).

Este análisis se ha hecho mediante WB debido a que mediante IF no pudimos detectar dicha proteína.

Basados en las alteraciones descritas anteriormente en cuanto a la proteína Tau en los cultivos mutados, y el patrón de fosforilación también observado en las mismas células mutadas se puede afirmar que el modelo neuronal desarrollado *in vitro* a partir de las hiPSC del paciente portador de la mutación puede considerarse un modelo *in vitro* de esta prionopatía familiar (**Figura 29B**).

Las alteraciones gliales que se han descrito en el apartado anterior cobran aún mayor relevancia en el contexto de que los hallazgos en esta patología no se habían observado previamente *in vitro*, habiéndose reportado únicamente la presencia de acúmulos de Tau y gliosis histopatológicamente en el cerebro del paciente donde fue caracterizada dicha mutación.

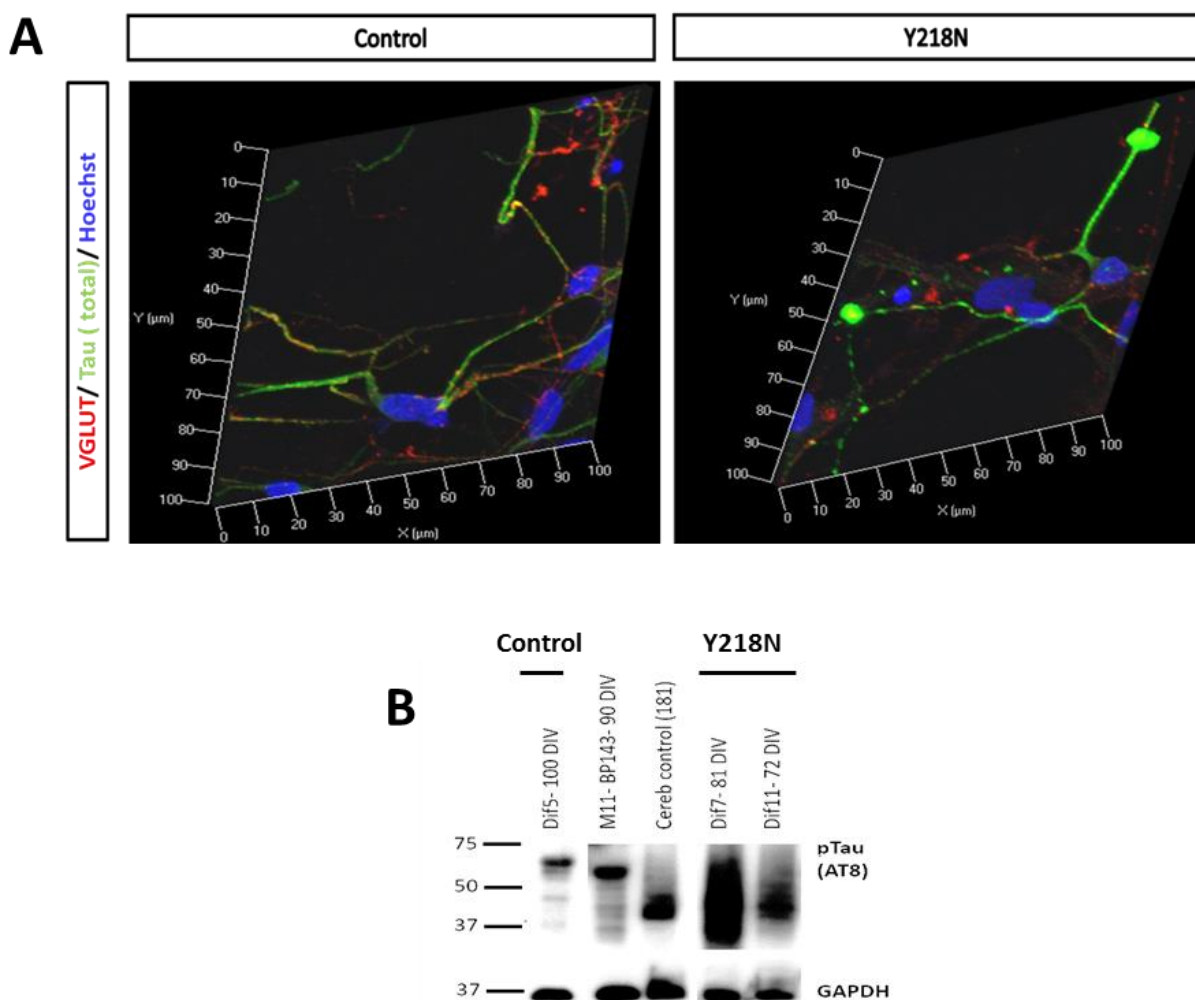


Figura 29. Análisis de expresión de Tau en neuronas derivadas a partir de *hiPSC*-control y mutadas a través del tiempo. A) IF en neuronas control y Y218N para la detección de vGLUT1 y *Tau* a estadio temprano de diferenciación neuronal (DIV 60). Las células fueron fijadas e inmunoteñidas con anti-vGLUT1 y anti-Tau. Los núcleos teñidos con Hoechst. Microscopía confocal stack 63x. B) Imágenes representativas del análisis de expresión Tau fosforilada (AT8) en los extractos celulares derivados de *hiPSC*-control y mutadas mediante WB. Incluimos en este análisis muestra de cerebelo de donante sano

como control y de otra línea de *hiPSC* control diferenciada a neuronas M11 BP143 a DIV 90. Anticuerpo primario AT8. GAPDH como control de carga. DIV: días *in vitro*.

Una vez caracterizados los cultivos celulares (mutados y control) se preparó el material biológico (homogeneizados de cerebro) procedente de pacientes sanos y afectados por alguna prionopatía. En este grupo se incluyó una muestra de cerebro de un paciente emparentado con aquel del que procedían los fibroblastos reprogramados y que portaba la mutación Y218N. Estas muestras se prepararon para ser utilizadas como inóculos en el ensayo de infección persistente con priones humanos.

ENSAYO DE INFECTIVIDAD

Detección de los niveles de PrP^{res} presente en los inóculos

Seleccionamos tres fuentes distintas representativas de inóculos identificados como 1) *scrapie*: prión de *scrapie* adaptado en hámster (encéfalo de hámster inoculado con *scrapie* 263K). Este inóculo se eligió por su demostrada incapacidad en experimentos *in vivo* de propagarse en un contexto de PrP humana y por contener una PrP detectable por el anticuerpo 3F4 que permitiría evaluar la desaparición del inóculo a través de los pases realizados a las células), 2) *ECJ*: distintos encéfalos humanos diagnosticados con *ECJ* y 3) GSS: encéfalo humano diagnosticado con GSS-Y218N (**Figura 30**). Una vez obtenidos los homogeneizados de encéfalo al 10% se procesaron (digirieron) y analizaron mediante *WB*. Este estudio permitió confirmar la presencia de PrP^{res} en cada uno de las muestras a utilizar como inóculos. En el caso de los inóculos de *scrapie* y *ECJ* se muestra el patrón clásico de glicosilación; (di, mono y no glicosilada). Sin embargo, el patrón de GSS-Y218N observado es

atípico sin la presencia de una tri-banda y con la aparición de bandas resistentes de 8-15 kDa (Piccardo, Liepnieks et al. 2001).

El material infeccioso descrito anteriormente se utilizó en tres ensayos de infección en los cultivos neuronales humanos:

1) Ensayo de infectividad en neuronas Y218N a DIV 30 y control a DIV 40. 2) ensayo de infectividad en neuronas Y218N y control a DIV 60. 3) ensayo de infectividad en neuronas control a DIV 80.

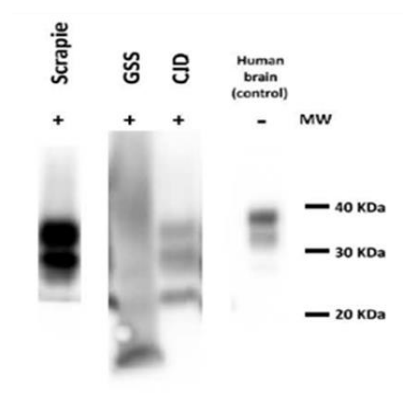


Figura 30. Western blot de cerebros infecciosos. Los inóculos a partir de tres fuentes (homogeneizados de encéfalo al 10%) se procesaron para mostrar la señal de PrP^{res}. Identificados como *scrapie*: encéfalo de hámster inoculado con la cepa 263K (prión de *scrapie* adaptado en hámster). *ECJ*: encéfalo humano diagnosticado con *ECJ*, y *GSS*: encéfalo humano diagnosticado de *GSS* portador de la mutación Y218N. Las muestras de *scrapie* y *ECJ* se digirieron con 50 µg/ml de PK y se sometieron a un análisis bioquímico estándar. La muestra de *GSS* fue tratada como muestra de prión anormal (ver metodología en Material y Métodos). Encéfalo de donante sano como control positivo a la expresión de PrP^C. El símbolo +/- indican la presencia/ausencia de pretratamiento con PK. PK: proteinasa K. Anticuerpo monoclonal 3F4 para la detección de PrP. MW: marcadores moleculares.

Ensayo 1 en neuronas jóvenes

El primer ensayo de infectividad se realizó en neuronas jóvenes, las células Y218N llevaban 30 días de diferenciación *in vitro*, y las células control 40 días por motivos de manejo y obtención de *hiPSC*.

Las neuronas Y218N (Diferenciación 11- infección VI) fueron incubadas con homogeneizados de encéfalo de pacientes que habían desarrollado *ECJ* (8.2 y 6.3), *GSS* (Y218N) y cerebro de hámster infectado con *scrapie* adaptado.

Las neuronas control (Diferenciación 5- infección I) fueron incubadas con homogeneizados de encéfalo de pacientes que habían desarrollado *ECJ* (8.2), así como, *ECJe*, *ECJg*.

Como controles en ambas condiciones se utilizaron: 1) un homogeneizado de donante sano como control negativo a la infección y 2) un cultivo celular sin infectar. Tras una incubación de 10 días (ver esquema en Materiales y métodos) y la retirada del inóculo, las neuronas recibieron un total de 12 o 13 pases desde la retirada del inóculo. En algunos de estos pases se recogió una muestra para su análisis mediante *WB*.

Los resultados de *WB* utilizando los primeros pases reveló la presencia de formas de PrP resistentes a proteasas (26 días después de haber sido inoculadas y 16 días después de la eliminación del inóculo infeccioso de *scrapie*). Los cultivos celulares inoculados con *ECJ* (8.2) y *scrapie* mostraron una resistencia a PK que no se mantuvo a tiempos más tardíos (hasta DIV 119, pase 12) (**Figura 31**).

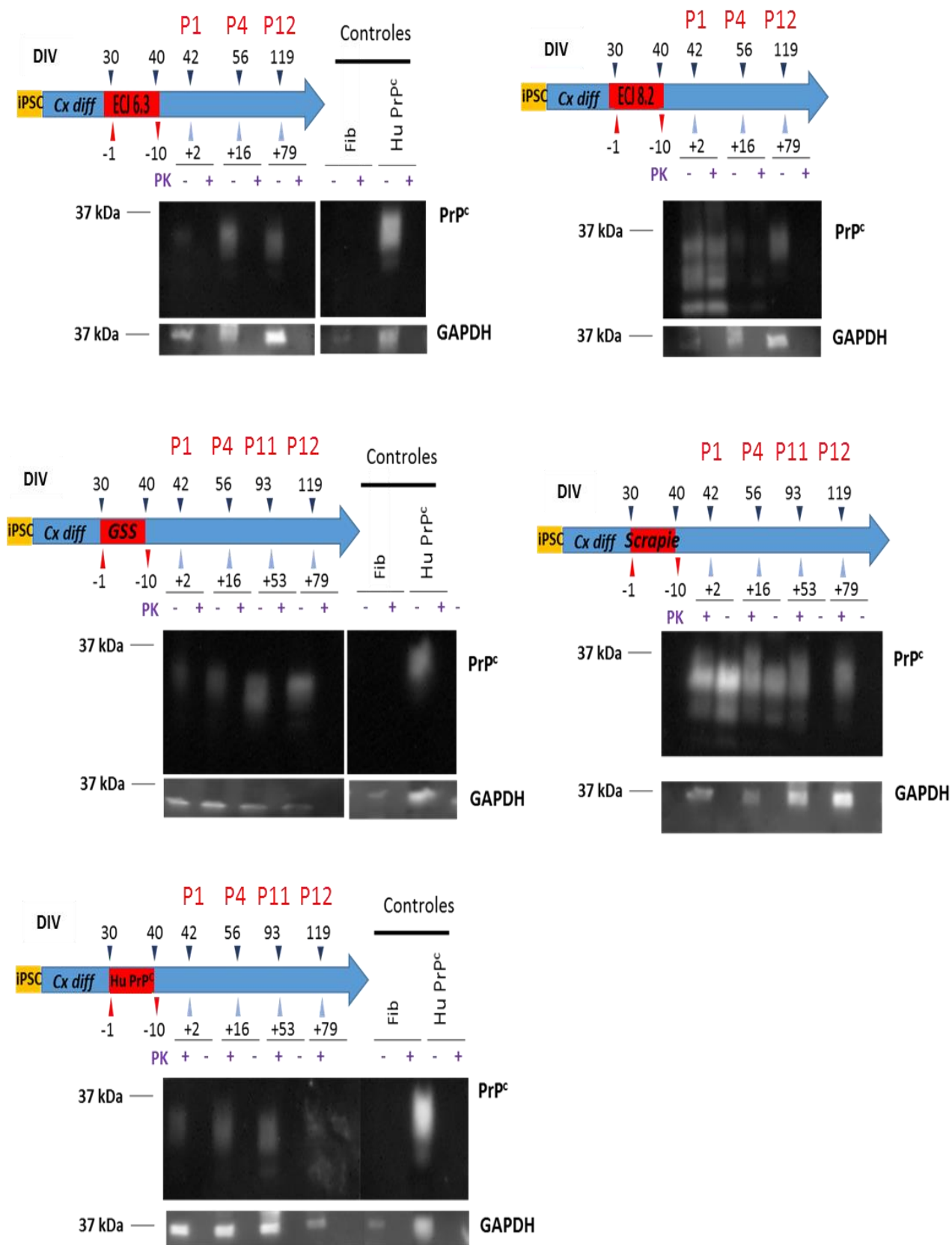


Figura 31. Ensayo de infectividad en neuronas jóvenes Y218N inoculadas a DIV 30 con inóculos infecciosos de origen cerebral. Ejemplos representativos de detección mediante WB de formas de PrP^c resistentes a PK después de la inoculación con ECJ (8.2 y 6.3), GSS-Y218N y scrapie en neuronas jóvenes

(DIV 30, infección VI). La presencia de formas de PrP resistentes a PK sólo se objetivó durante los primeros 4 pases en los cultivos celulares inoculados con *ECJ* (8.2) y *scrapie*. El inóculo de *scrapie* fue utilizado como control para evaluar cuánto se tardaba en eliminar el inóculo de partida. El inóculo de cerebro sano y células sin inocular se utilizaron como controles negativos. El encéfalo de donante sano como control positivo de expresión de PrP^c. Las muestras fueron digeridas con 2,5 µg/ml de PK. PK: proteinasa K. El símbolo +/- indica la presencia/ausencia de pre-tratamiento con PK. Flecha pequeña roja: periodo de incubación con priones; flecha pequeña azul claro: días post eliminación del inóculo; flecha pequeña azul marino: días *in vitro* de las células. Letra "P" color rojo: pase celular. Se utilizó el anticuerpo monoclonal 3F4 para la detección de PrP. El GAPDH se utilizó como control de carga. DIV: Días *in vitro*. *hiPSC*: células madre humanas pluripotentes inducidas. *Cx diff*: Diferenciación cortical. MW: marcadores moleculares.

En los cultivos control, también se observaron formas de PrP resistentes a PK en los primeros días (pase 1) después de la eliminación del inóculo infeccioso (a día 68 de maduración *in vitro*); sin embargo, al igual que las células mutadas esta señal no se mantuvo en el tiempo para ninguno de los inóculos empleados (Figura 32).

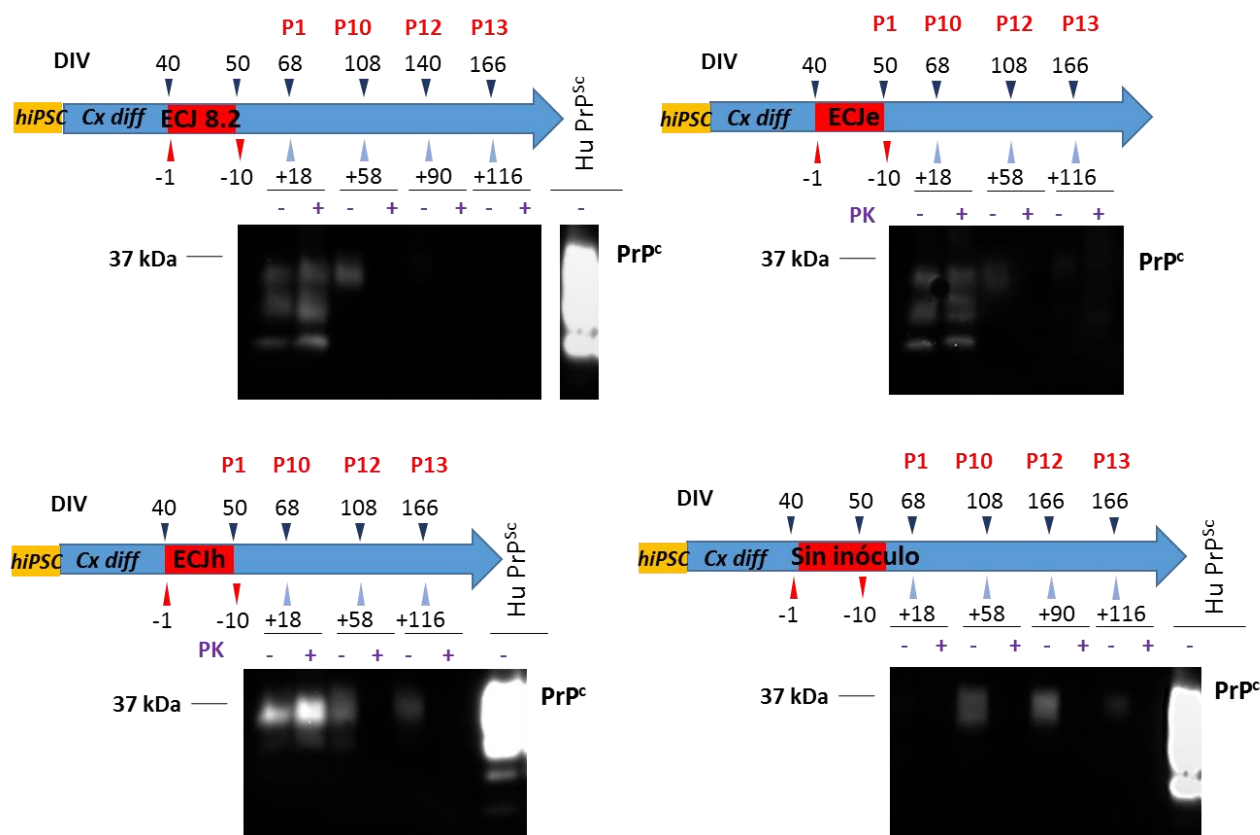


Figura 32. Ensayo de infectividad en neuronas jóvenes control inoculadas a DIV 40 con inóculos infecciosos de origen cerebral mediante WB. A) Detección de las formas de PrP resistentes a PK en extractos celulares de neuronas control inoculadas a DIV 40 con distintos inóculos de *ECJ* mediante WB

Ejemplos representativos de detección mediante WB de formas de PrP resistentes a PK después de la inoculación con distintos inóculos de *ECJ* (*ECJe VV2 (8.2)*, *ECJe* y *ECJg*) en neuronas jóvenes (DIV 40, infección V). La presencia de formas de PrP resistentes a PK sólo se objetivó durante los primeros 18 dpi en el pase 1 en los cultivos celulares inoculados con los inóculos de *ECJ* (*ECJe VV2 (8.2)*, *ECJe* y *ECJg*), lo que indica ausencia de infectividad en estas condiciones. Las células sin inocular se utilizaron como controles negativos. Encéfalo infeccioso de GSS-Y218N como control positivo a la expresión de PrP^{res}. Las muestras fueron digeridas con 2,5 µg/ml de PK. PK: proteinasa K. El símbolo +/- indica la presencia/ausencia de pre-tratamiento con PK. Flecha pequeña roja: periodo de incubación con priones; flecha pequeña azul claro: días post eliminación del inóculo; flecha pequeña azul marino: días *in vitro* de las células. Letra "P" color rojo: pase celular. Se utilizó el anticuerpo monoclonal 3F4 para la detección de PrP. El GAPDH se utilizó como control de carga. DIV: Días *in vitro*. *hiPSC*: células madre humanas pluripotentes inducidas. *Cx dlff*: Diferenciación cortical.

Ensayo 2 en neuronas jóvenes

Dada la ausencia de formas de PrP resistentes a PK en el primer ensayo, se realizó una segunda infección donde se inocularon neuronas control y mutadas a día 60 de maduración *in vitro* (Diferenciación 5- infección III y Diferenciación 6- infección VII) con distintos inóculos de *ECJ*, en el caso de los cultivos control y GSS-Y218N, *ECJ (8.2 y 6.3)* y *scrapie*, en el caso de los cultivos Y218N.

En este ensayo se realizaron 6 pases seriados en neuronas control y 13 pases en neuronas mutadas desde la retirada del inóculo.

En las células Y218N, se observaron formas de PrP resistentes a PK en los primeros días (pase 1) después de la eliminación del inóculo infeccioso (a día 76 de maduración *in vitro*), en los cultivos inoculados con *ECJ 8.2* y *scrapie*; sin embargo, esta señal no se mantuvo en el tiempo para ninguno de los inóculos empleados (**Figura 33A**).

En las células control, no se encontró ninguna forma PrP^{res} en ninguno de los cultivos inoculados con los distintos inóculos de *ECJ* a lo largo de todo el experimento (hasta 97 días post inoculación a DIV 167) (**Figura 33B**).

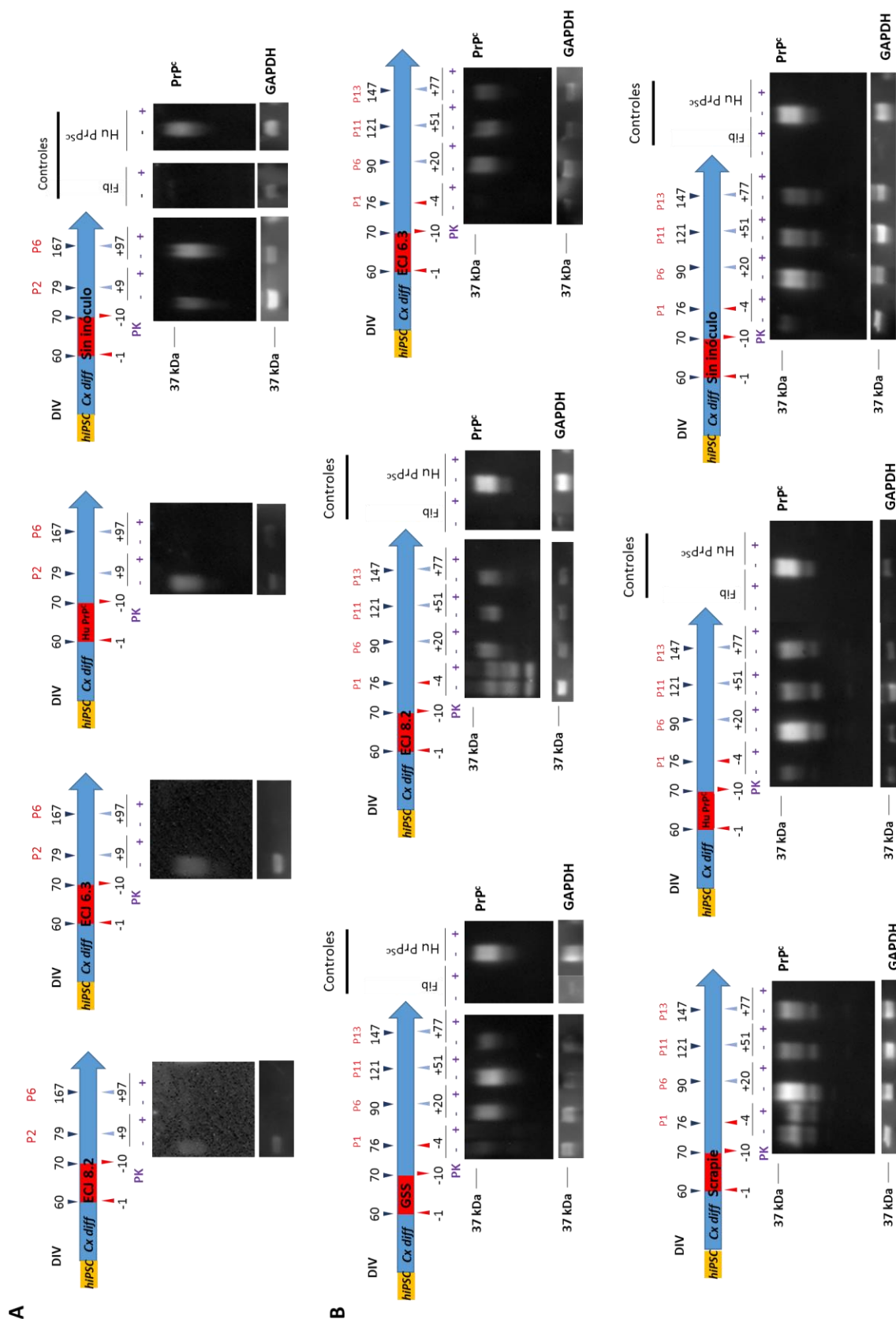


Figura 33. Detección de las formas de PrP resistentes a PK en extractos celulares de neuronas control y mutadas (DIV 60) inoculadas con distintos inóculos de *ECJ* (8.2 y 6.3), *GSS*-Y218N y *scrapie* mediante *WB*. Ejemplos representativos de detección de las formas de PrP resistentes a PK en extractos celulares mediante *WB* después de la inoculación con los inóculos de *ECJ* (8.2 y 6.3) en neuronas control (DIF 5)

(Figura A) y de GSS-Y218N, *ECJ* (8.2 y 6.3) y *scrapie* en neuronas mutadas (DIF 11) (figura B) mediante el análisis de extractos celulares por *WB*. Durante el ensayo de infectividad se realizaron 6 pases seriados en neuronas control y 13 pases en neuronas mutadas. Ambas condiciones fueron inoculadas a DIV 60. A) Las neuronas control no mostraron formas resistentes en ninguno de los tiempos. B) Las formas PrP^{res} presentes en las células inoculadas con GSS-Y218N, *ECJ* (8.2) y *scrapie* durante el primer pase (4 días antes de eliminar el inóculo de partida) corresponden a la señal del inóculo original. Los fibroblastos-control/Y218N y las neuronas no inoculadas se utilizaron como controles negativos. El inóculo de *scrapie* se utilizó como control de la eliminación del inóculo de partida. El encéfalo de donante sano se utilizó como control positivo de expresión de PrP^C. Las muestras fueron digeridas con 2,5 µg/ml de PK. PK: proteinasa K. El símbolo +/- indica la presencia/ausencia de pre-tratamiento con PK. Flecha pequeña roja: periodo de incubación con priones; flecha pequeña azul claro: días post eliminación del inóculo; flecha pequeña azul marino: días *in vitro* de las células. Letra "P" color rojo: pase celular. El anticuerpo monoclonal 3F4 se utilizó para la detección de PrP. GAPDH se utilizó como control de carga. DIV: Días *in vitro*. *hiPSC*: células madre humanas pluripotentes inducidas). *Cx diff*: Diferenciación cortical.

Ensayo 3 en neuronas en estadios más avanzados de maduración

Ante los resultados negativos observados en los ensayos anteriores, se decidió realizar un tercer ensayo de infectividad, inoculando neuronas control a estadios más avanzados de maduración neuronal (DIV 80) (Diferenciación 5- infección V), con material infeccioso de GSS-Y218N, IFF, *ECJ* y *scrapie*. Es importante resaltar, que en este experimento esperamos hasta 177 días de maduración *in vitro* para el análisis de las neuronas. Dado que se desconoce *a priori* si la replicación de los priones pudiera requerir de tiempos de exposición aún más prolongados al material infeccioso, se decidió dejar las mismas condiciones de infección utilizadas en los dos anteriores ensayos. Al igual que en los experimentos anteriores, se observó una *señal* de PrP^{res} casi imperceptible en los tiempos próximos a la inoculación, por lo que dicha señal de resistencia a PK muy probablemente corresponde al inóculo de partida (Figura 34).

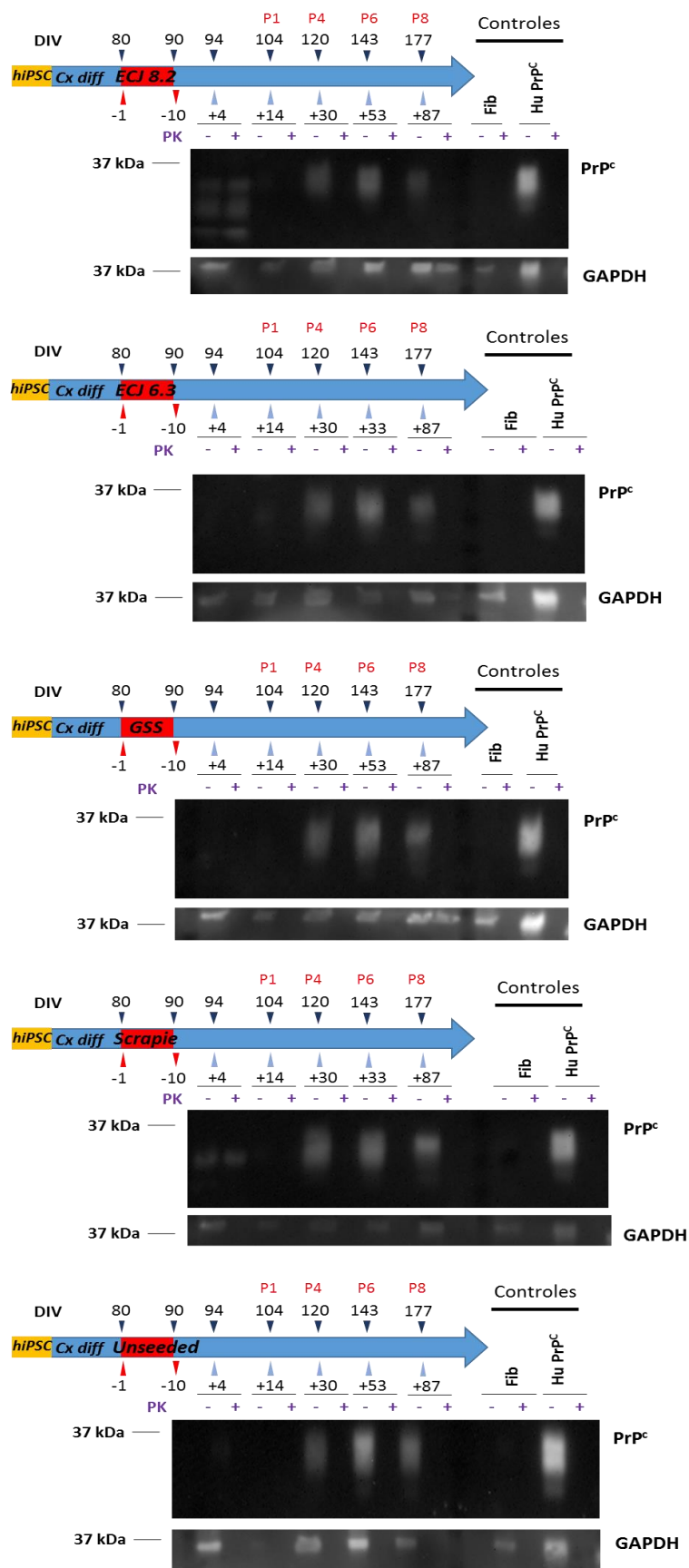


Figura 34. Ensayo de infectividad en neuronas control en etapa avanzada de maduración *in vitro* (DIV 80) con inóculos infecciosos de origen cerebral. Ejemplos representativos de detección mediante WB

de formas de PrP resistentes a PK después de la inoculación con *ECJ*, GSS-Y218N, IFF y *scrapie* en neuronas maduras (DIV 80, infección V). A lo largo del ensayo se realizaron 8 pases seriados. La presencia de formas de PrP resistentes a PK sólo se objetivó durante los primeros 4 dpi en los cultivos celulares inoculados con *ECJ* (8.2) y *scrapie*. El inóculo de *scrapie* fue utilizado como control para evaluar cuánto se tardaba en eliminar el inóculo de partida. Fibroblastos y células sin inocular se utilizaron como controles negativos a la expresión de PrP^C. El encéfalo de donante sano como control positivo de expresión de PrP^C. Las muestras fueron digeridas con 2,5 µg/ml de PK. PK: proteinasa K. El símbolo +/- indica la presencia/ausencia de pre-tratamiento con PK. Flecha pequeña roja: periodo de incubación con priones; flecha pequeña azul claro: días post eliminación del inóculo; flecha pequeña azul marino: días *in vitro* de las células. Letra "P" color rojo: pase celular. Se utilizó el anticuerpo monoclonal 3F4 para la detección de PrP. El GAPDH se utilizó como control de carga. DIV: Días *in vitro*. *hiPSC*: células madre humanas pluripotentes inducidas. *Cx dlff*: Diferenciación cortical.

Dada la ausencia de PrP resistente a PK después de la inoculación con una variedad de muestras infecciosas en tres ensayos diferentes, se procedió a realizar un análisis mediante IF de la presencia de otros cambios que pudieran estar relacionados con la exposición al inóculo infeccioso. Este análisis solo se realizó en los ensayos 1 y 3.

Análisis de la presencia de cambios morfológicos en cultivos inoculados con priones

En el primer ensayo de infección y en particular, en los cultivos mutados a DIV 30, se analizaron muestras celulares que habían sido fijadas a DIV 95, con 9 días post plaqueo y 55 días después de haber eliminado el inóculo de partida. La **figura 35** muestra una representación micrográfica de las proteínas PrP^C, DCX y GFAP mediante IF. La intensidad de la inmunorreactividad de PrP^C, se vio ligeramente disminuida en todos los cultivos que habían sido inoculados. DCX se mantuvo sin cambios aparentes, por lo que se sugirió un escaso efecto de los inóculos sobre las neuronas mutadas, con excepción de los inóculos de *scrapie*. En esta condición, se percibió un descenso significativo en el número de células neuronales acompañado de una hiperplasia de la glía que se interpretó como citotoxicidad por exposición a xeno antígenos.

En el mismo sentido, se observaron cambios leves de inmunoreactividad en los cultivos inoculados con el material infeccioso de *ECJ* (8.2).

Neuronas corticales derivadas de *hiPSC- Y218N*

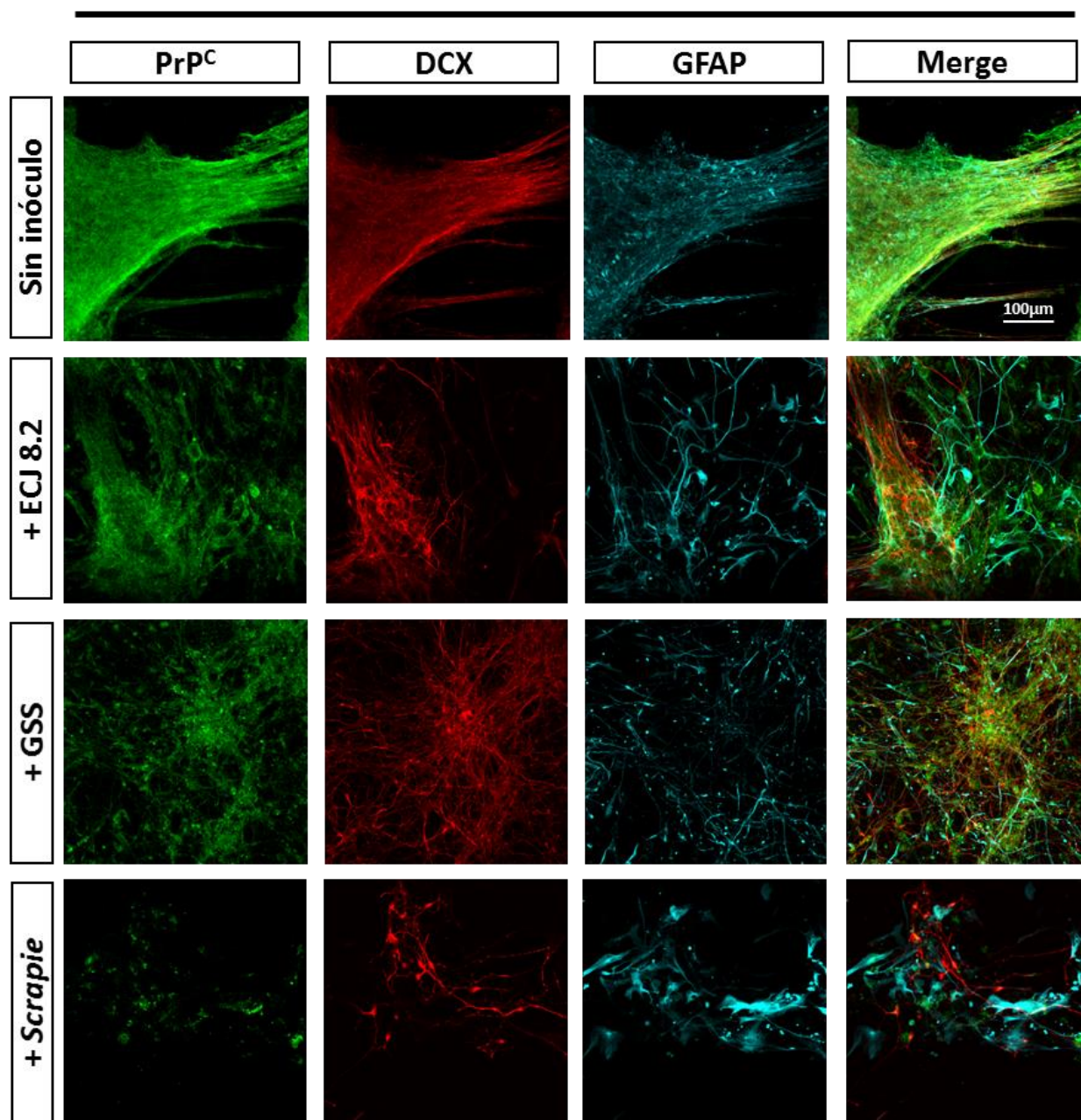


Figura 35. Análisis de expresión de PrP^C, DCX, GFAP en neuronas jóvenes Y218N inoculadas con distintos priones (Inoculación VI). Las células fijadas e inmunoteñidas a DIV 95, con 9 días post plaqueo y 55 días después de haber eliminado el inóculo de partida, revelan un efecto escaso por parte de los inóculos empleados, pero con claros signos de toxicidad (muerte neuronal y neuroglia reactiva) en neuronas Y218N expuestas a *scrapie* probablemente asociados a una presencia prolongada del inóculo en el cultivo. En el caso del inóculo *ECJ* se

observaron cambios leves de *inmunoreactividad*. Controles negativos (no inoculados) sin cambio alguno. Anticuerpos empleados: 3F4-PrP^C, DCX y GFAP. Microscopía confocal 20x. Barras de escala: 100 μ m.

En el caso de los cultivos control inoculados a día 40 (**Figura 36**), los estudios de IF realizados en células a los 70 días de haber sido eliminado el inóculo infeccioso (DIV 130), mostraron que con el inóculo de *ECJ 8.2* y *scrapie*, DCX presentaba una mayor señal en el soma y neuritas proximales gruesas, lo cual posiblemente fuera el resultado de una elevada pérdida de neuritas distales por degeneración de los procesos neuronales. Por lo tanto, DCX probablemente también puede darnos indicios de citotoxicidad.

Se observaron cambios leves de inmunoreactividad a GFAP en los cultivos inoculados con el material infeccioso de *ECJ (8.2)*.

A destacar, la existencia de una gliosis masiva y muerte neuronal elevada, tras la exposición a cerebros con *scrapie* en las células control; esto se achacó a que el inóculo de hámster utilizado provenía de una mezcla de cerebros con un tiempo postmortem desconocido (podría haber existido algo de auto-lisis previa) que pudiera llevar a la citotoxicidad observada.

Neuronas corticales derivadas de *hiPSC*- control

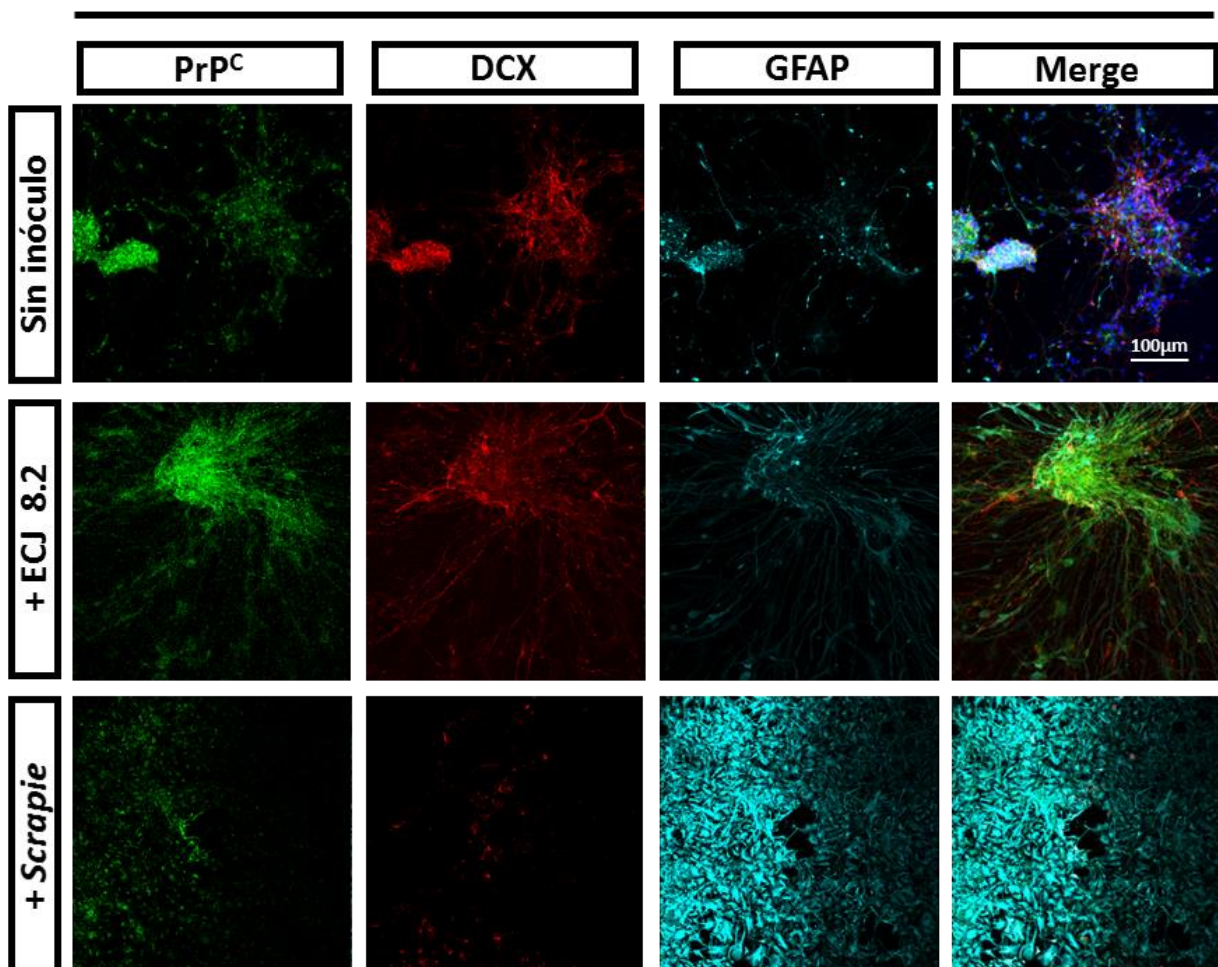


Figura 36. Análisis de expresión de PrP^C, DCX y GFAP en neuronas jóvenes control inoculadas con distintos priones (Inoculación V). Las imágenes representativas en inmunofluorescencia de las células analizadas 70 días después de haber sido eliminado el inóculo de partida revelaron un escaso efecto citotóxico por parte de los inóculos de *ECJ*. En el caso del inóculo *ECJ* 8.2 se observaron cambios leves de inmunorreactividad y claros signos de toxicidad celular (muerte neuronal y neuroglia reactiva). Estos cambios probablemente están asociados a una presencia prolongada del inóculo en los cultivos. Controles negativos (no inoculados) sin cambio alguno. Anticuerpos empleados: 3F4-PrP^C, DCX y GFAP. Neuronas a 72 dpi. Barras de escala: 100 μm

Dado lo llamativo de esta proliferación glial, incluimos un ejemplo micrográfico a mayor aumento (**Figura 37**).

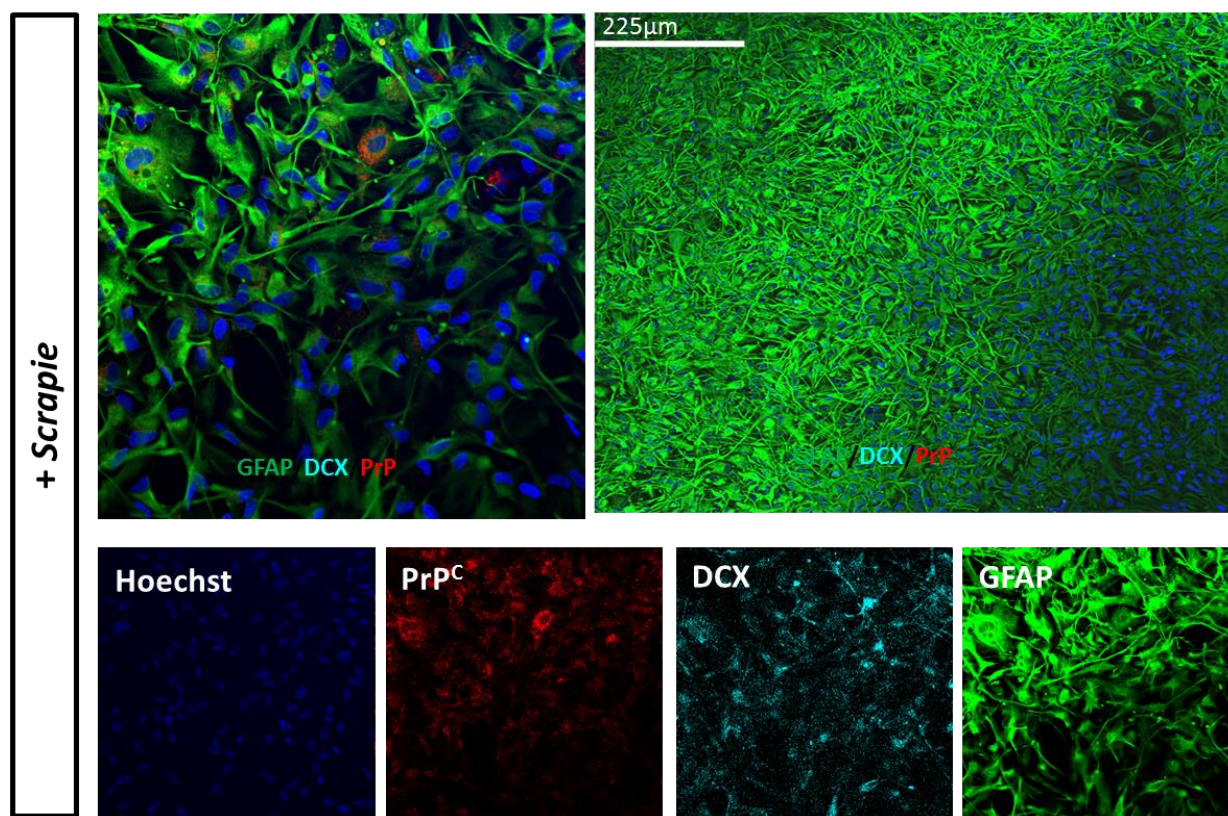


Figura 37. Análisis de expresión de PrP^C, DCX y GFAP en neuronas jóvenes control inoculadas *scrapie* (Inoculación V). Las imágenes representativas en inmunofluorescencia de las células analizadas 70 días después de haber sido eliminado el inóculo de partida revelaron un intenso efecto citotóxico (inmunorreactividad de la glía y claros signos de toxicidad celular (muerte neuronal y neuroglia reactiva)), por parte de los inóculos de *scrapie*. Estos cambios probablemente están asociados a una presencia prolongada del inóculo en los cultivos. Controles negativos (no inoculados) sin cambio alguno. Anticuerpos empleados: 3F4-PrP^C, DCX y GFAP. Neuronas a 72 dpi.

En el caso de los cultivos control inoculados a DIV 80, los estudios de IF realizados en células a los 60 días después de eliminar el inóculo infeccioso (DIV 140) mostraron presencia de células gliales ligeramente reactivas en todas las que habían sido inoculadas con los inóculos infecciosos *ECJ* 8.2 y 6.3; GSS-Y218N, IFF y *scrapie*. En el caso de DCX, se observó una casi imperceptible disminución, mientras que PrP^C se mostró intacta (**Figura 38**).

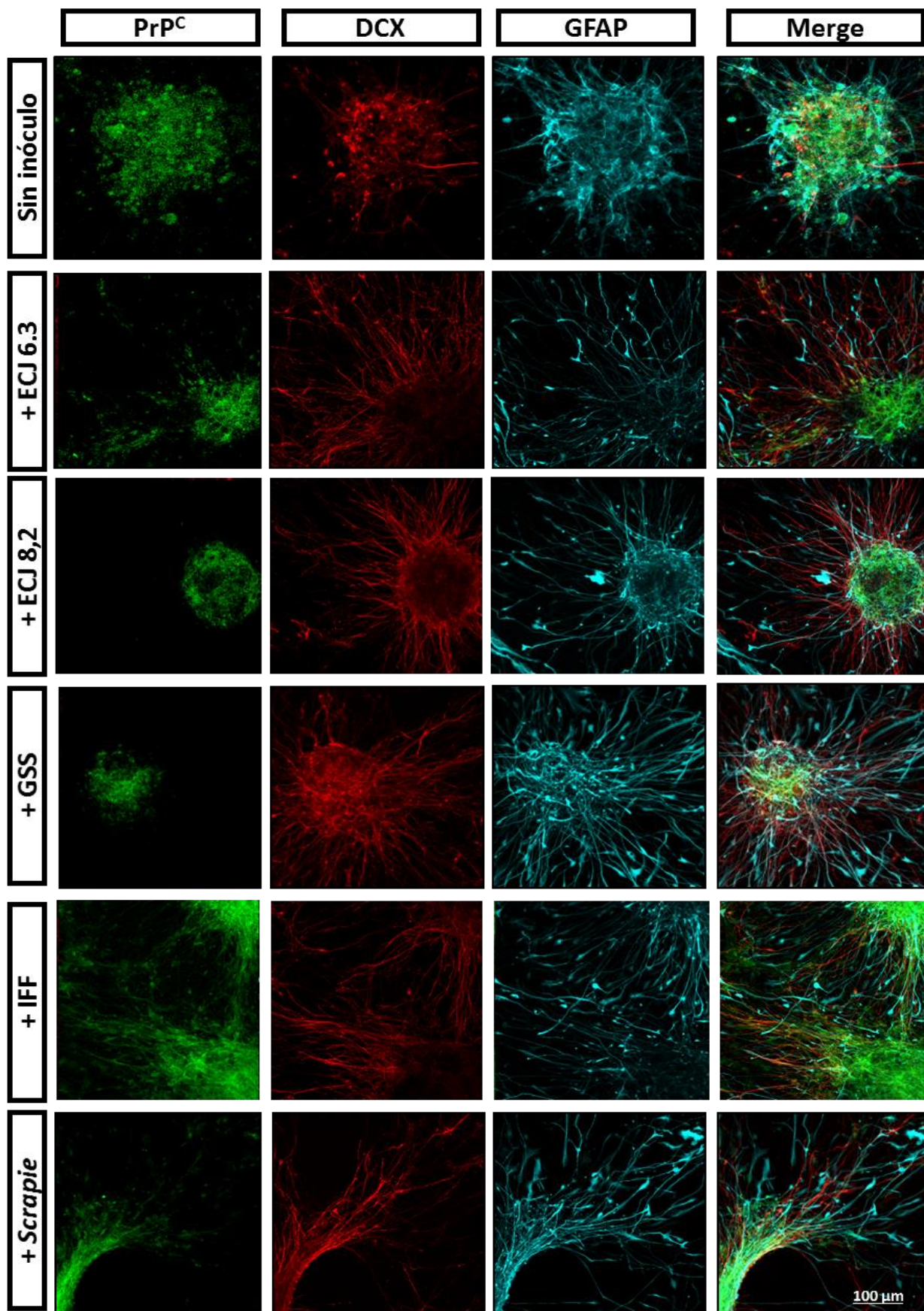


Figura 38. Análisis de expresión de *PrP^C*, *DCX* y *GFAP* en neuronas inoculadas a DIV 80 con distintos priones (Inoculación V). La morfología analizada 2 meses después de haber sido eliminado el inóculo de

partida reveló un escaso efecto citotóxico por parte de los inóculos con una glía levemente reactiva. Controles negativos (no inoculados) sin cambio alguno. Anticuerpos empleados: 3F4-PrP^C, DCX y GFAP. Neuronas a 60 dpi; dpi: días post inoculación. Microscopía confocal 20x. Barras de escala: 100 μ m.

Expresión de Tau

Con el objetivo de estudiar si los cultivos celulares inoculados presentaban algún acúmulo anómalo de Tau, éstos fueron analizados mediante IF.

Las células mutadas que habían sido inoculadas a DIV 30 con GSS-Y218N y *ECJ* (8.2 y 6.3), fueron analizadas a los 71 dpi (DIV 101) (**Figura 39A**) mostraron un aumento de la señal Tau citoplasmática; así como, una redistribución de Tau de las neuritas distales hacia el soma de las neuronas (**flechas blancas en la figura 39A**). Este resultado se evidencia especialmente al comparar la expresión de la proteína Tau en las células infectadas respecto a los cultivos no inoculados, las cuales aparte de evidenciar cambios en Tau muestran un aumento en el número de células gliales reactivas presentes en los cultivos.

Un estudio más detallado de las células inoculadas con *ECJ* (8.2 y 6.3) (**Figura 39B**) y GSS-Y218N (**Figura 39C**) mostró en algunas células una aparente co-localización de Tau y GFAP.

Neuronas corticales derivadas de *hiPSC*- control

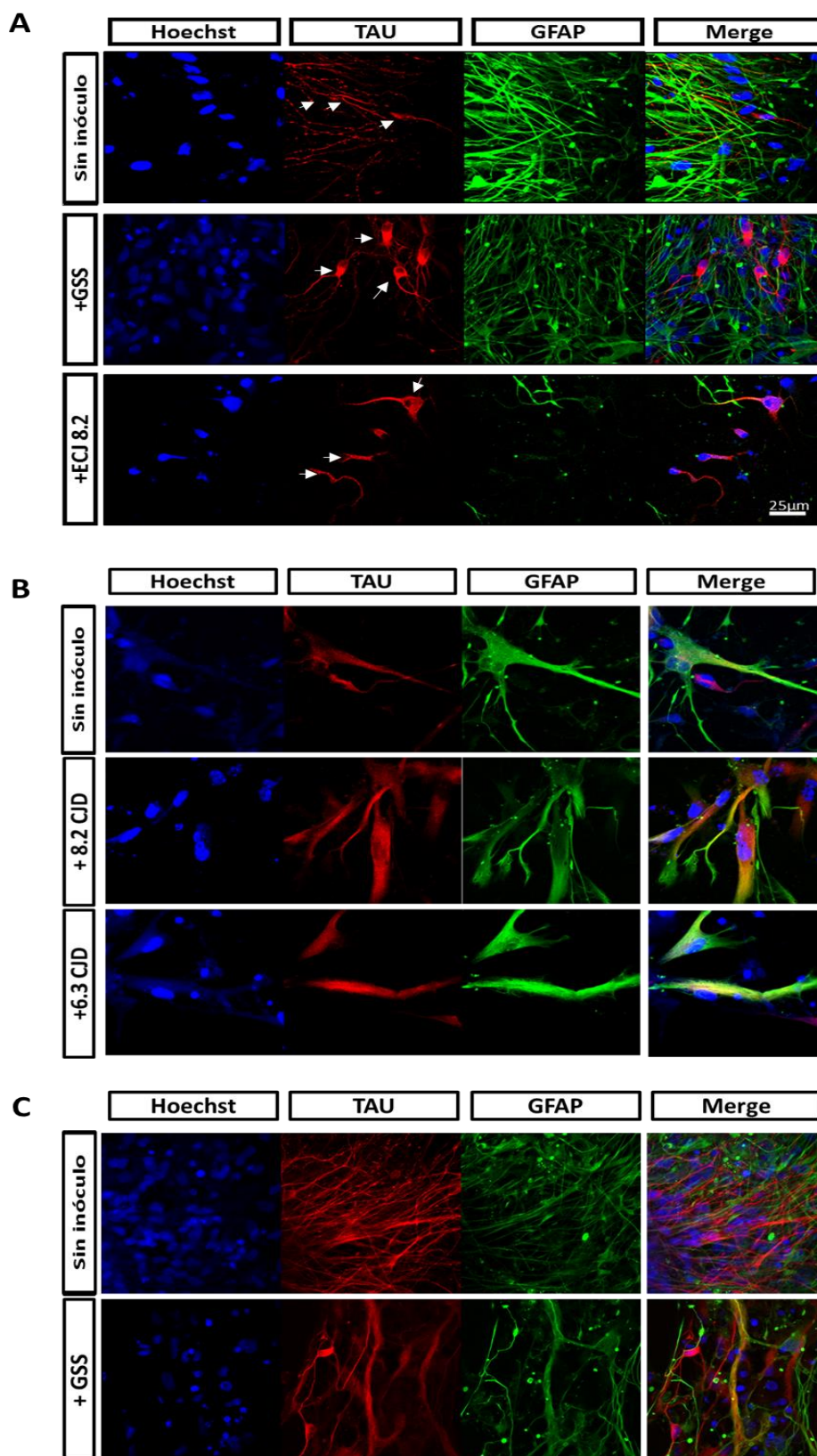


Figura 39. Análisis de expresión y distribución de Tau en neuronas jóvenes Y218N inoculadas a DIV 30 con distintos priones (Inoculación VI). La expresión y distribución de Tau 71 dpi observada mediante IF

reveló un aumento en la señal citoplasmática, así como una redistribución de Tau en el soma de las neuronas en los cultivos Y218N inoculados con GSS-Y218N y *ECJ* (flechas blancas), con una presencia de glía reactiva en los cultivos expuestos a *ECJ*. Microscopía confocal 40x. Barras de escala: 25µm. dpi: días post inoculación. **C-D)** Co-localización de Tau con la glía en neuronas inoculadas con *ECJ* (8.2 y 6.3) y GSS-Y218N. Anticuerpos empleados: Tau y GFAP. Neuronas a 101 dpi. Barras de error 30 µm (GSS-Y218N) y 15 µm (*ECJ* (8.2 Y 6.3)).

En las células control inoculadas a DIV 40 con *scrapie* y analizadas a DIV 110, se evidenció que, a los 60 dpi, no se observó cambio alguno después de haber retirado el inóculo. Este resultado está en consonancia con lo mostrado previamente por *WB*, donde no se presenciaba PrP^{res} ni siquiera a tiempos tempranos (**Figura 40**) y, por tanto, puede ser un fallo en la expresión.

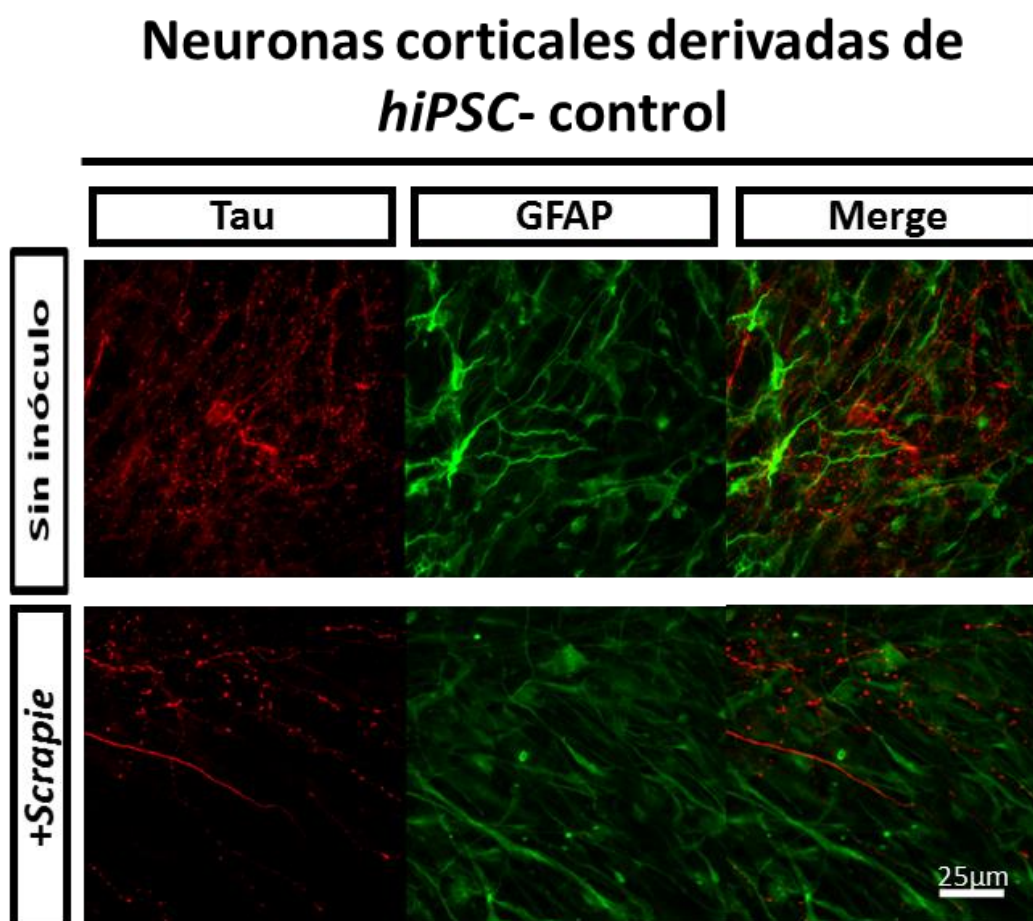


Figura 40. Análisis de expresión y distribución de Tau en neuronas control inoculadas a DIV 40 con distintos priones (Inoculación V). La expresión y distribución de Tau en neuronas fijadas e inmunoteñidas a DIV 110, 60 dpi y observada mediante IF reveló una disminución en la señal en los cultivos inoculados con *scrapie* acompañados de una gliosis reactiva. Anticuerpos empleados: Tau y GFAP. Microscopía confocal 40x. Barras de escala: 25µm

En las células control inoculadas a DIV 80, analizamos la expresión de la proteína Tau a DIV 130 (60 días post inoculación). La imagen representativa de la **figura 41** muestra como la proteína Tau se mantuvo sin cambios aparentes, aunque acompañada de una gliosis reactiva en las células que se habían inoculado con *ECJ* (8.2) y GSS-Y218N.

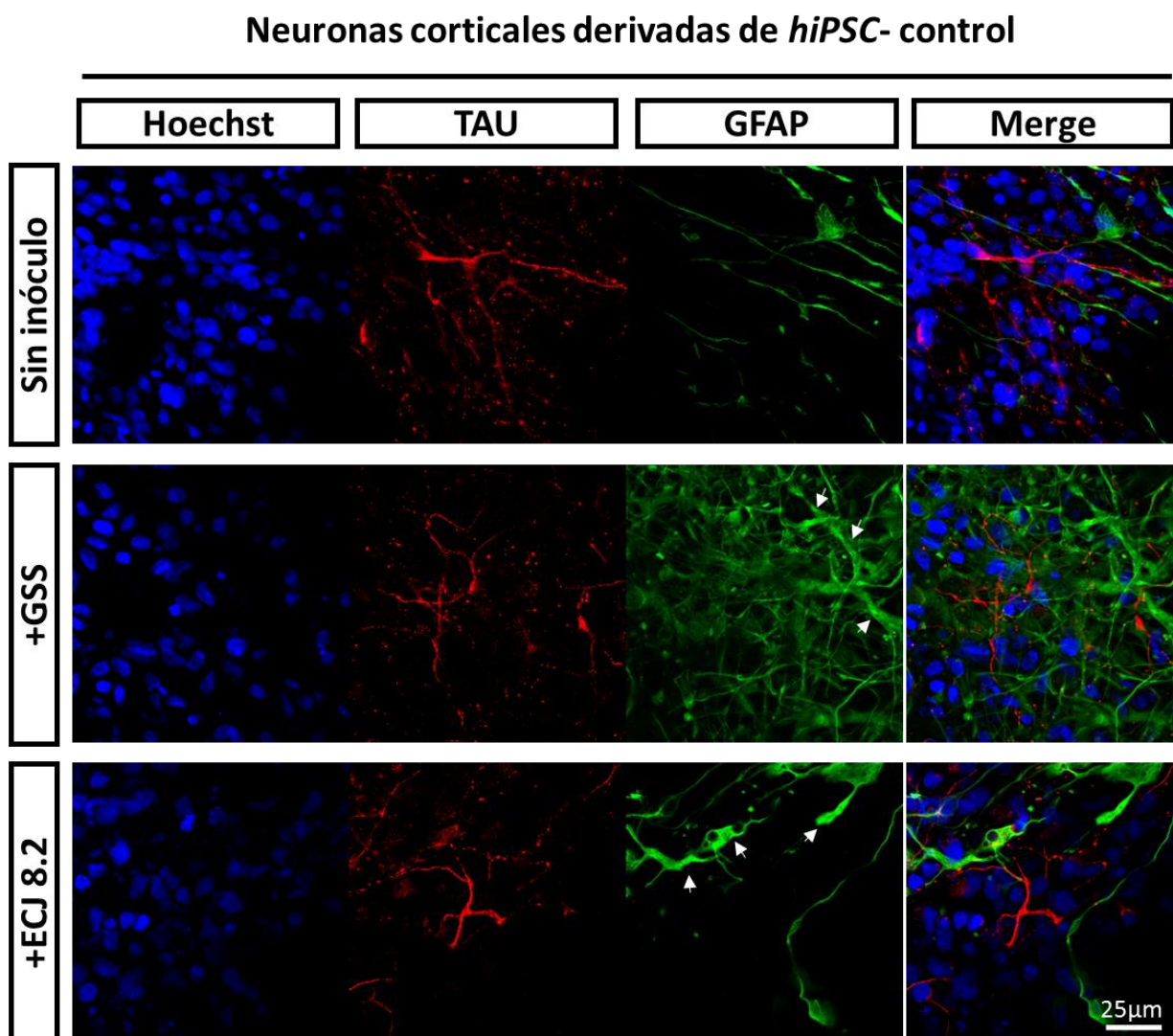


Figura 41. Análisis de expresión y distribución de Tau en neuronas control inoculadas a DIV 80 con distintos priones (Inoculación VI). Las IF de Tau en neuronas control inoculadas a DIV 80 y fijadas a DIV 130 (2 meses post inoculación) no mostraron cambios aparentes en su expresión y distribución. Se observa presencia de células gliales reactivas en los cultivos inoculados con *ECJ*. Anticuerpos empleados: Tau y GFAP. Neuronas a 60 dpi. dpi: días post inoculación. Microscopía confocal 40x. Escala de Barras 25µm.

Dada la ausencia de cambios en la distribución de Tau en las neuronas control, en contraste con los cambios observados en las neuronas portadoras de la mutación Y218N, se sugiere que el inóculo actúa como un factor precipitante o acelerador del fenotipo asociado con la mutación. Este fenotipo que describimos en los estudios basales recapitula los hallazgos neuropatológicos descritos en un cerebro de un paciente portador de la mutación Y218N dado que consiste en gliosis, pérdida de marcadores neuronales, apoptosis y redistribución subcelular de Tau.

DISCUSIÓN

Aplicación de las neuronas derivadas de *hiPSC* como modelo de prionopatías hereditarias:

Hemos reprogramado y diferenciado células *hiPSC* de una prionopatía hereditaria a neuronas telencefálicas por primera vez, y observado una serie de rasgos fenotípicos en estos cultivos. Dichos cambios, podrían estar asociados a la presencia de la mutación Y218N, sugiriendo que estas células constituyen un modelo neuronal humano *in vitro* útil para el estudio de las prionopatías hereditarias.

A pesar de haber utilizado células de pacientes de edad avanzada, fuimos capaces de obtener células pluripotentes, que permitieron la obtención de neuronas telencefálicas. Se han utilizado las *hiPSC in vitro* para modelar distintas enfermedades neurodegenerativas como AD (Mungenast, Siegert et al. 2015), Parkinson (Zhao, Luo et al. 2014), y esclerosis lateral amiotrófica (Sances, Bruijn et al. 2016) entre otras. De forma análoga, consideramos que sería posible modelar la patología cerebral presente en las prionopatías.

Aun con la variabilidad observada en las diferenciaciones de *hiPSC in vitro*, al realizar varias diferenciaciones independientes, hemos evidenciado el mismo fenotipo. Esto sugiere que el fenotipo está relacionado con la presencia de la mutación. Más aun las diferencias fenotípicas que hemos observado son similares a los hallazgos neuropatológicos reportados en las EETs. La gliosis, pérdida neuronal y alteraciones en la proteína Tau, cobran especial relevancia debido a su similitud con alteraciones reportadas en el cerebro del paciente portador de la mutación Y218N (Alzualde, Indakoetxea et al. 2010). La ausencia de formas PrP^{res} en las células mutadas, era hasta cierto punto esperable, dado que la mutación Y218N corresponde a una forma atípica de prionopatía que no muestra PrP^{res} clásica. Nuestros resultados confirman que nuestra mutación por sí misma, no es un factor suficiente para la aparición de PrP^{res}.

Aun así, tendríamos que hacer una corrección genética para obtener un control isogénico y tener la certeza de que los cambios fenotípicos observados en los cultivos Y218N son causados directamente por la mutación.

Ensayos de infectividad en los cultivos neuronales:

El objetivo de nuestro trabajo fue conseguir un modelo neuronal humano para propagar priones humanos *in vitro*, objetivo nunca antes logrado. Al contar con inóculos infecciosos humanos, algunos incluso provenientes de familiares del paciente utilizado para la obtención de las células, y cultivos neuronales humanos, evitaríamos la barrera de transmisión entre especies. De acuerdo con nuestra hipótesis, la presencia de la mutación en *PRNP* en nuestros cultivos, aumentaría la susceptibilidad a la infección con priones, mientras que los cultivos carentes de la mutación, podrían mostrar una mayor dificultad para ser infectados. Además, pensamos que la ausencia de PrP^{res} en la mutación Y218N sería en cierta medida una ventaja para detectar la presencia de infección mediante la detección de formas clásicas resistentes a proteasas.

Sin embargo, la ausencia de formas de PrP^{res} en los cultivos inoculados con distintos priones humanos, nos lleva a concluir que no fuimos capaces de propagar ninguno de los inóculos utilizados en este estudio. Aunque este resultado podría parecer decepcionante, tenemos que asumir que nadie hasta el momento ha logrado infectar células humanas *in vitro*. El motivo o los motivos que impiden esta infección se desconocen, aunque más abajo discutiremos posibles limitaciones metodológicas y biológicas que podrían ayudar a esclarecer este aspecto.

La no propagación de priones humanos en los cultivos inoculados pudo ser debido a diferentes factores:

Un aspecto crítico es el reconocimiento a nivel de la membrana entre el inóculo y la célula, de forma que la presencia o ausencia de propiedades, estructuras o sustancias especiales que facilitan la unión de PrP^C a PrP^{Sc} (comentado por Grassmann, Wolf et al. 2013) propias o ajenas a la célula podría ser determinante. Entre estos factores se encuentran receptores, diferencias en los segmentos o regiones de PrP (Comentado por Grassmann, Wolf et al. 2013), la integridad de las balsas lipídicas (Marella, Lehmann et al. 2002, Wadia, Schaller et al. 2008, Gousset and Zurzolo 2009, Goold, Rabbanian et al. 2011, Grassmann, Wolf et al. 2013) y también factores exógenos, como la utilización de enzimas durante la disgregación celular (Misumi, Misumi et al. 1986, Doms, Russ et al 1989), que eliminan ciertos epítomos de la superficie celular.

Dada la dificultad de infectar a las neuronas primarias, en comparación con los cerebros de los animales, es probable que la necesidad de otros tipos celulares, presentes *in vivo*, pero no *in vitro*, sea determinante. Nuestros cultivos a pesar de tener una cierta complejidad (obtenemos distintos tipos neuronales y distintos tipos de glía), carecen de otros elementos como son la vasculatura, la microglía y las meninges. No podemos descartar que algunos de estos elementos estén jugando un papel *in vivo*, (Sarasa, Martinez et al. 2012, Hernandez, Sarasa et al. 2014) que facilite la infección y propagación de priones.

En los cultivos inoculados hemos observado un efecto citotóxico que parece independiente de su incapacidad de inducir el mal plegamiento de la PrP endógena. Por el contrario, algunos estudios previos han reportado una propagación de príones en cultivo sin la producción de citotoxicidad aparente (Krejciova, Pells et al. 2011, Herbst, Banser et al. 2013,

Brown, Schmidt et al. 2014, Munoz-Gutierrez, Schneider et al. 2015). La ausencia de alteraciones fenotípicas en varios de nuestros cultivos, coinciden con lo reportado por autores donde han empleado modelos celulares humanos (Krejciova, Pells et al. 2011) o modelos de cortes organotípicos de otras especies (Falsig, Julius et al. 2008, Falsig, Sonati et al. 2012, Wolf, Hossinger et al. 2015). Por otro lado, los hallazgos morfológicos evidenciados en los cultivos mutados inoculados con *ECJ* y *GSS*, son semejantes a los reportados por Iwamaru y colaboradores en el 2013; así como, Wolf y colaboradores en el 2016 (Iwamaru, Takenouchi et al. 2013, Wolf, Hossinger et al. 2015).

En el caso de los cultivos con la mutación se observó una exacerbación y anticipación de la expresión de rasgos fenotípicos, que hemos interpretado como dependientes de la mutación. En este sentido, cabe destacar los cambios en la señal de la proteína Tau y su redistribución en el citoplasma de las neuronas, así como, la co-localización de Tau y GFAP.

Por otro lado, nuestro modelo celular al estar formado por neuronas y astrogliá, posiblemente en conjunto “sobre activen” mecanismos o cofactores en el momento de la detección de determinados agentes patógenos exógenos, dado que en condiciones normales las células activan mecanismos proteolíticos reguladores con la finalidad de eliminar los agentes patógenos. Estas vías de control de calidad de proteínas son suficientes en condiciones normales, pero en respuesta a determinados eventos ya sean ambientales, genéticos y / o de mal plegamiento proteico, la capacidad de corrección de estas vías es insuficiente y lleva a la acumulación de agregados y, en última instancia, a la citotoxicidad acompañada por perturbaciones celulares que resultan de ellas como apoptosis y muerte neuronal.

El hecho de que se observaran rasgos similares en los cultivos inoculados con el prión de *scrapie*, apoya la interpretación de que lo que hemos observado es un efecto citotóxico y no

una respuesta a la infección priónica, dado que las células humanas no son susceptibles a la infección con este agente patógeno. En nuestros cultivos inoculados con el prión de *scrapie* los cambios fueron muy marcados posiblemente debido a la incompatibilidad de las proteínas entre el cerebro de hámster y las células neuronales humanas, detectando a la proteína de *scrapie* como un agente patógeno extraño. No podemos descartar que el efecto observado sea debido no a la presencia de PrP^{Sc} de hámster sino a algún otro componente del homogeneizado de cerebro utilizado. Algunos otros modelos celulares que han empleado inóculos de *scrapie* no han reportado citotoxicidad (Munoz-Gutierrez, Schneider et al. 2015). Sin embargo, los cambios morfológicos reportados en modelos animales inoculados con éste agente infeccioso son similares a nuestros resultados (Sarasa, Martinez et al. 2012, Hernandez, Sarasa et al. 2014).

La inoculación de cultivos celulares con priones puede o no producir apoptosis celular, concordando con lo reportado por diversos autores (Krejciova, Pells et al. 2011, Song, Honmou et al. 2011, Falsig, Sonati et al. 2012, Iwamaru, Takenouchi et al. 2013, Munoz-Gutierrez, Schneider et al. 2015, Munoz-Gutierrez, Aguilar Pierle et al. 2016), donde al parecer el desencadenamiento de los mecanismos apoptóticos depende del agente patógeno inoculado.

Un resultado sorprendente fue que los efectos observados tras la inoculación de homogeneizados cerebrales fueron de mayor magnitud en los cultivos inoculados en estadios tempranos de maduración *in vitro* que en los más tardíos. De cualquier forma, es necesario mencionar que los cultivos inoculados se disgregaron y replaquearon y durante este proceso se pudieron seleccionar las células menos afectadas, resultando en un cierto enmascaramiento del efecto citotóxico.

Ventajas y limitaciones del modelo celular:

Entre las limitaciones que pudimos observar en este estudio se encuentran las siguientes:

Para la obtención y mantenimiento de *hiPSC*, es necesario contar con personal que tenga experiencia y conocimientos específicos en el área; así como, trabajar bajo determinadas condiciones experimentales, que permiten la obtención de *hiPSC* con una adecuada pluripotencia y autorrenovación; condiciones estrictamente necesarias para una buena diferenciación neuronal.

Nuestro modelo al depender de que las células se encuentren mitóticamente activas y estar en proceso de diferenciación y maduración, experimenta constantes cambios que dificultan la reproducibilidad de los resultados. En este sentido, la aparición de cambios fenotípicos en los estadios de maduración tardía tiene la desventaja de que puede estar sujetos al impacto de otras variables durante más tiempo. Además, las neuronas mantenidas durante tantos meses en cultivo son más vulnerables y pueden sufrir daños secundarios a la simple manipulación. Un modelo deseable es el que presenta el fenotipo en etapas muy tempranas de la maduración. Sin embargo, hay que considerar que, aunque la enfermedad en los individuos se presenta en edades avanzadas, en los modelos *in vitro* se ve acelerada la presentación del fenotipo. Por ejemplo, en *hiPSC* derivadas de pacientes con mutaciones asociadas a enfermedad de Alzheimer se han podido caracterizar alteraciones en el ratio de ABeta40/42 desde el DIV50 y acúmulos de APP en las células portadoras de duplicación a partir del DIV80 de diferenciación (Moore, Evans et al. 2015). Esto es importante porque permite describir eventos secuenciales, por ejemplo, en fosforilación y acumulación de Tau y examinar el efecto de modificadores en estos modelos a tiempos relativamente cortos (2-3 meses).

Por otro lado, el entorno estrictamente necesario para hacer los experimentos tanto de obtención de neuronas telencefálicas portadoras de una mutación que conducen al desarrollo de prionopatías hereditarias, así como los ensayos de infección con priones, solo se pueden llevar a cabo en instalaciones específicas, utilizando determinados protocolos de bioseguridad por personal entrenado para la manipulación de este tipo de cultivos celulares y a manipulación de material biológico infeccioso. Al necesitar de un entorno especial para los ensayos de infección no hemos podido documentar con mayor precisión los experimentos realizados en este estudio, dado que ciertos procesos que en un laboratorio de cultivos celulares son estándar, no estaban disponibles. Un ejemplo de ello es la imposibilidad de la realización de tomas fotográficas a los cultivos inoculados a distintos dpi.

Otra limitación se ha encontrado en la propagación de las neuronas maduras dado que la disgregación ocasiona un mayor daño celular a medida que avanza su estadio de maduración *in vitro*. Tampoco fuimos capaces de identificar la conversión de PrP^C a su forma infecciosa mediante IF, ni garantizar que la PrP^{res} *de novo* en los primeros pases se correspondía a la señal del inóculo de partida, debido a la falta de anticuerpos específicos para la detección de PrP^{Sc} en las muestras celulares. En este último aspecto, al igual que otros estudios (Cronier, Laude et al. 2004, Giri, Young et al. 2006), no pudimos eliminar el inóculo de partida tan fácilmente. Tal vez se ha debido en parte al tipo de revestimiento (poli-L-lisina-laminina) empleado sobre las placas de cultivo para mantener a las neuronas en condiciones de adhesión específicas. También será necesario optimizar la etapa de desnaturalización de proteínas para hidrolizar a la PrP^C y poder revelar los epítomos de PrP^{Sc} dado que posiblemente se necesite menor tiempo de desnaturalización, pensando en que la PrP *de novo* sea una proteína muy lábil a elevadas temperaturas.

Ventajas observadas en nuestro trabajo:

A pesar de evidenciar limitaciones en nuestros modelos celulares utilizados, es preciso señalar importantes ventajas, tales como:

Nuestro modelo celular expresa cantidades óptimas de PrP^C de forma natural (endógena) y no de una forma forzada (sobreexpresión o expresión por manipulación genética).

Hoy en día, el diagnóstico de las prionopatías se realiza cuando el paciente presenta los síntomas clínicos, haciendo crucial el estudio en estadios tempranos, cuando aún no se ha desarrollado la enfermedad. Nuestro modelo será de gran utilidad para diseccionar los mecanismos patogénicos que envuelve a estas enfermedades, pudiéndose utilizar distintas *hiPSC* provenientes de pacientes portadores en distintos estadios asintomáticos. Esto permitirá dilucidar la influencia de distintos factores como la edad y tipo de mutación en la eficiencia de diferenciación y en el fenotipo.

Hasta el momento no hay estudios en los que indiquen la posibilidad de detectar Tau o sus isoformas a partir de modelos celulares derivados de *hiPSC*, por lo que las neuronas mutadas constituyen un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos implicados en la agregación de Tau y su posible efecto neurotóxico

Los cultivos incubados con los inóculos nos han permitido ver que las neuronas jóvenes portadoras de la mutación Y218N, presentan una aceleración de la patología donde posiblemente los priones sean los culpables de precipitar el desarrollo de un fenotipo degenerativo.

Este modelo nos ha permitido realizar ensayos de infección con priones en neuronas a distintos estadios de maduración *in vitro*. El uso de este tipo de células en estadios avanzado de maduración no ha sido reportado hasta el momento, haciendo que nuestro modelo sea el único en su tipo. Fuimos capaces de duplicar el tiempo de experimentación en los cultivos celulares inoculados. Los modelos habitualmente empleados, suelen reportar periodos de tiempo que van desde unos pocos días hasta un máximo de cinco semanas de experimentación (Milhavet, Casanova et al. 2006, Krejciova, Pells et al. 2011, Hannaoui, Maatouk et al. 2013, Herbst, Banser et al. 2013, Hollister, Lee et al. 2015). Los únicos ensayos de infección superiores a 11 semanas, han sido realizados en modelos que no son mitóticamente activos (Tark, Kim et al. 2015, Wolf, Hossinger et al. 2015).

Logramos evidenciar que el periodo de incubación prolongado no es la única variable que sea determinante para lograr la infección en las células, dado a que no conseguimos infección pese a utilizar incubación de 10 días con los inóculos infecciosos. (Hannaoui, Maatouk et al. 2013, Iwamaru, Takenouchi et al. 2013, Munoz-Gutierrez, Schneider et al. 2015, Tark, Kim et al. 2015, Munoz-Gutierrez, Aguilar Pierle et al. 2016). Hasta la fecha, no hemos encontrado modelos celulares humanos derivados a partir de *hiPSC* que hayan reportado el papel de la glía o las alteraciones que sufre ésta por la presencia de fuentes infecciosas naturales (cerebro de pacientes con EETs). Hay estudios donde han reportado la detección inmunológica frente a GFAP en cerebelos afectados de pacientes con *ECJ* (Manuelidis, Tesin et al. 1987, Muhleisen, Gehrman et al. 1995, Sarasa, Martinez et al. 2012, Hernandez, Sarasa et al. 2014) por lo que, nuestros modelos celulares mutados y no mutados, serán de gran interés para caracterizar el papel de las células gliales en presencia de inóculos infecciosos, así como su impacto para prevenir o favorecer la transmisión de priones. Hay pocos modelos *in vitro* útiles para el

estudio de citotoxicidad causada por priones dado que son modelos difíciles de generar (comentado por (Grassmann, Wolf et al. 2013, Brown, Schmidt et al. 2014). Por lo que nuestro modelo es un excelente candidato para dilucidar las bases moleculares de esta citotoxicidad.

Aspectos a considerar en un futuro:

Por todo lo reportado anteriormente consideramos que en el futuro sería necesario completar este estudio en varios aspectos tales como:

Comparar los niveles de expresión de PrP^C de nuestro modelo celular mutado y el no mutado, con otros tipos neuronales obtenidos *in vitro*.

El protocolo utilizado para la infección con priones no ha sido capaz de infectar nuestros cultivos *in vitro*, por lo que será necesario modificar el protocolo de inoculación, incluyendo en los ensayos de infección otras cepas de priones humanos. A esto se le podría incluir tanto nuevas cepas obtenidas de forma natural como priones recombinantes humanos (hoy en día empleados en ensayos *in vitro* con la técnica de *PMCA*). Por otro lado, determinar si los priones humanos utilizados en este estudio tienen la capacidad de infectar otros modelos neuronales, del mismo o de distinto tipo neuronal, obtenidos a partir de *hiPSC* y *hESC*, utilizando las mismas técnicas de reprogramación y diferenciación neuronal. En términos de tamaño de partícula será interesante emplear inóculos purificados y/o sonicados, para verificar si efectivamente el tamaño de partícula influye en el éxito de infección. No sabemos si el tipo celular por si solo o la mutación, o ambos, limitan o impiden la infección por parte de los priones de origen humano.

Al tratarse de un modelo *in vitro*, no es una representación exacta del microambiente específico y complejo presente en un cerebro *in vivo*, lo que podría ser una limitación para lograr la propagación de los priones. Se necesita optimizar aún más el método de

diferenciación neuronal empleado y dilucidar qué tipo de cofactores o elementos del microambiente faltan para conseguir una propagación de priones mantenida.

La obtención de cultivos neuronales puros (sin células gliales) será necesaria para corroborar si la patogénesis de la citotoxicidad es autónoma de las células telencefálicas o dependiente de la glía. Se ha comentado previamente que algunas sustancias bioactivas presentes en los homogeneizados cerebrales podrían ser las causantes de la citotoxicidad (Falsig, Sonati et al. 2012, Iwamaru, Takenouchi et al. 2013). En esta línea sería interesante caracterizar de forma más pormenorizada los homogeneizados utilizados como inóculo y por otro lado analizar si la PrP expresada en nuestros cultivos pierde o adquiere ciertas funciones que desencadenan apoptosis (Jin, Sun et al. 2003) *in vitro*.

En las neuronas portadoras de la mutación Y218N sería informativo evaluar el efecto de otros insultos o tóxicos, por ejemplo, con exposición a neurotransmisores excitotóxicos como el glutamato, neurotoxinas o estrés oxidativo, para determinar si la anticipación de los cambios fenotípicos que observamos con los inóculos es inespecífica. Esto sería de gran utilidad para acortar la duración de los ensayos en estudios dirigidos a evaluar posibles agentes modificadores o terapéuticos en el futuro.

Queda también pendiente determinar la capacidad de propagación de esta prionopatía *in vivo*.

CONCLUSIONES

1.- La presencia de la mutación Y218N no interfirió con la reprogramación celular ni con el proceso de neurogénesis y diferenciación neuronal pudiéndose obtener neuronas telencefálicas en todos los cultivos.

2.- La PrP^C se expresó de forma robusta en las neuronas telencefálicas humanas derivadas de *hiPSC in vitro*. Dichas neuronas expresaron la forma celular de PrP a partir del día 15 de maduración *in vitro* y su expresión se mantuvo al menos hasta el día 180 de diferenciación. La expresión de PrP^C se incrementó conforme avanzaba el estadio de maduración neuronal.

3.- En las neuronas telencefálicas portadoras de la mutación Y218N no se evidenció la presencia de formas resistentes a proteinasa K clásicas.

4.- En los cultivos neuronales telencefálicos de las células portadoras de la mutación Y218N se observó una mayor expresión de GFAP por presencia de células de la glía reactiva y, en la fase de diferenciación tardía, una mayor apoptosis, así como una disminución de la expresión de marcadores neuronales maduros.

5.- En los cultivos neuronales telencefálicos de las células portadoras de la mutación Y218N se observaron mayores niveles de Tau hiperfosforilada respecto a los controles. Por todo ello, se considera que las neuronas portadoras de la mutación Y218N podrían constituir un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos implicados en la agregación de Tau y su posible efecto neurotóxico en el contexto de las prionopatías hereditarias.

6.- Ninguno de los inóculos priónicos utilizados se propagó en los cultivos de neuronas telencefálicas portadoras de la mutación Y218N, ni tampoco en las neuronas control. Estos resultados sugieren la ausencia de algunos cofactores necesarios en la propagación de priones en cultivos celulares.

7.- La infección de las neuronas mutadas con algunos de los inóculos desencadenó: i) cambios significativos en la redistribución de Tau, ii) una mayor presencia de células de la glía reactivas, iii) cambios morfológicos en la glía y iv) fagocitosis glial y apoptosis. Estos resultados sugieren que los inóculos utilizados, a pesar de no inducir el malplegamiento de la PrP^C endógena, desencadenaron un efecto citotóxico en algunos cultivos inoculados.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguzzi, A., F. Baumann and J. Bremer (2008). "The prion's elusive reason for being." Ann Rev Neurosci **31**: 439-477.
- Aguzzi, A. and A. M. Calella (2009). "Prions: protein aggregation and infectious diseases." Physiol Rev **89**(4): 1105-1152.
- Aguzzi, A. and M. Heikenwalder (2006). "Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook." Nat Rev Microbiol **4**(10): 765-775.
- Aguzzi, A., M. Heikenwalder and M. Polymenidou (2007). "Insights into prion strains and neurotoxicity." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 552-561.
- Aguzzi, A., F. Montrasio and P. S. Kaeser (2001). "Prions: health scare and biological challenge." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 118-126.
- Aguzzi, A. and M. Polymenidou (2004). "Mammalian prion biology: one century of evolving concepts." Cell **116**(2): 313-327.
- Akimov, S., I. Vasilyeva, O. Yakovleva, C. McKenzie and L. Cervenakova (2009). "Murine bone marrow stromal cell culture with features of mesenchymal stem cells susceptible to mouse-adapted human TSE agent, Fukuoka-1." Folia Neuropathol **47**(2): 205-214.
- Akimov, S., O. Yakovleva, I. Vasilyeva, C. McKenzie and L. Cervenakova (2008). "Persistent propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease agent in murine spleen stromal cell culture with features of mesenchymal stem cells." J Virol **82**(21): 10959-10962.
- Alperovitch, A., I. Zerr, M. Pocchiari, E. Mitrova, J. de Pedro Cuesta, I. Hegyi, S. Collins, H. Kretschmar, C. van Duijn and R. G. Will (1999). "Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet **353**(9165): 1673-1674.
- Alzualde, A., B. Indakoetxea, I. Ferrer, F. Moreno, M. Barandiaran, A. Gorostidi, A. Estanga, I. Ruiz, M. Calero, F. W. van Leeuwen, B. Atares, R. Juste, A. B. Rodriguez-Martinez and A. Lopez de Munain (2010). "A novel PRNP Y218N mutation in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary degeneration." J Neuropathol Exp Neurol **69**(8): 789-800.
- Alleaume-Butaux A, D. C., Pietri M, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2013). "Cellular prion protein is required for neuritogenesis: fine-tuning of multiple signaling pathways involved in focal adhesions and actin cytoskeleton dynamics." Cell Health and Cytoskeleton **5**: 1-12.
- Alleaume-Butaux, A., S. Nicot, M. Pietri, A. Baudry, C. Dakowski, P. Tixador, H. Ardila-Osorio, A. M. Haeberle, Y. Bailly, J. M. Peyrin, J. M. Launay, O. Kellermann and B. Schneider (2015). "Double-Edge Sword of Sustained ROCK Activation in Prion Diseases through Neuritogenesis Defects and Prion Accumulation." PLoS Pathog **11**(8): e1005073.
- Anderson, R. M., C. A. Donnelly, N. M. Ferguson, M. E. Woolhouse, C. J. Watt, H. J. Udy, S. MaWhinney, S. P. Dunstan, T. R. Southwood, J. W. Wilesmith, J. B. Ryan, L. J. Hoinville, J. E. Hillerton, A. R. Austin and G. A. Wells (1996). "Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle." Nature **382**(6594): 779-788.
- Anderson, S. and P. Vanderhaeghen (2014). "Cortical neurogenesis from pluripotent stem cells: complexity emerging from simplicity." Curr Opin Neurobiol **27**: 151-157.
- Ang, C. E. and M. Wernig (2014). "Induced neuronal reprogramming." J Comp Neurol **522**(12): 2877-2886.
- Aranda-Anzaldo, A. (1992). "Possible cell-free prion replication." Med Hypotheses **38**(3): 249-251.
- Archer, F., C. Bachelin, O. Andreoletti, N. Besnard, G. Perrot, C. Langevin, A. Le Dur, D. Vilette, A. Baron-Van Evercooren, J. L. Vilotte and H. Laude (2004). "Cultured peripheral neuroglial cells are highly permissive to sheep prion infection." J Virol **78**(1): 482-490.
- Arima, K., N. Nishida, S. Sakaguchi, K. Shigematsu, R. Atarashi, N. Yamaguchi, D. Yoshikawa, J. Yoon, K. Watanabe, N. Kobayashi, S. Mouillet-Richard, S. Lehmann and S. Katamine (2005). "Biological and biochemical characteristics of prion strains conserved in persistently infected cell cultures." J Virol **79**(11): 7104-7112.

- Avrahami, D. and R. Gabizon (2011). "Age-related alterations affect the susceptibility of mice to prion infection." Neurobiol Aging **32**(11): 2006-2015.
- Bailly, Y., A. M. Haeberle, F. Blanquet-Grossard, S. Chasserot-Golaz, N. Grant, T. Schulze, G. Bombarde, J. Grassi, J. Y. Cesbron and C. Lemaire-Vieille (2004). "Prion protein (PrPc) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain." J Comp Neurol **473**(2): 244-269.
- Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner and C. Weissmann (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." Cell **46**(3): 417-428.
- Beekes, M., E. Baldauf and H. Diringer (1996). "Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie." J Gen Virol **77** (Pt 8): 1925-1934.
- Beekes, M. and P. A. McBride (2000). "Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie." Neurosci Lett **278**(3): 181-184.
- Beekes, M. and P. A. McBride (2007). "The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies." FEBS J **274**(3): 588-605.
- Beekes, M., P. A. McBride and E. Baldauf (1998). "Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie." J Gen Virol **79** (Pt 3): 601-607.
- Belay, E. D. (1999). "Transmissible spongiform encephalopathies in humans." Annu Rev Microbiol **53**: 283-314.
- Benvegnu, S., I. Poggiolini and G. Legname (2010). "Neurodevelopmental expression and localization of the cellular prion protein in the central nervous system of the mouse." J Comp Neurol **518**(11): 1879-1891.
- Beraldo, F. H., C. P. Arantes, T. G. Santos, C. F. Machado, M. Roffe, G. N. Hajj, K. S. Lee, A. C. Magalhaes, F. A. Caetano, G. L. Mancini, M. H. Lopes, T. A. Americo, M. H. Magdesian, S. S. Ferguson, R. Linden, M. A. Prado and V. R. Martins (2011). "Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain." FASEB J **25**(1): 265-279.
- Beranger, F., A. Mange, J. Solassol and S. Lehmann (2001). "Cell culture models of transmissible spongiform encephalopathies." Biochem Biophys Res Commun **289**(2): 311-316.
- Berninger, B., M. R. Costa, U. Koch, T. Schroeder, B. Sutor, B. Grothe and M. Gotz (2007). "Functional properties of neurons derived from in vitro reprogrammed postnatal astroglia." J Neurosci **27**(32): 8654-8664.
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1992a). "Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent." J Virol **66**(4): 2096-2101.
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1992b). "Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters." J Gen Virol **73** (Pt 2): 329-334.
- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1994). "Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy." J Virol **68**(12): 7859-7868.
- Boellaard, J. W. and W. Schlote (1980). "[Subacute spongiform encephalopathy with multiform plaque formation. "Peculiar familial-hereditary disease of CNS [spinocerebellar atrophy with dementia, plaques, and plaque-like deposits in cerebellum and cerebrum" (Gerstmann, Strausler, Scheinker)] (author's transl)]." Acta Neuropathol **49**(3): 205-212.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." Science **218**(4579): 1309-1311.
- Bons, N., S. Lehmann, N. Mestre-Frances, D. Dormont and P. Brown (2002). "Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*." Transfusion **42**(5): 513-516.

- Borchelt, D. R., M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl and S. B. Prusiner (1990). "Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells." *J Cell Biol* **110**(3): 743-752.
- Bosque, P. J. and S. B. Prusiner (2000). "Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection." *J Virol* **74**(9): 4377-4386.
- Bosque, P. J., C. Ryou, G. Telling, D. Peretz, G. Legname, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2002). "Prions in skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3812-3817.
- Boulting, G. L., E. Kiskinis, G. F. Croft, M. W. Amoroso, D. H. Oakley, B. J. Wainger, D. J. Williams, D. J. Kahler, M. Yamaki, L. Davidow, C. T. Rodolfa, J. T. Dimos, S. Mikkilineni, A. B. MacDermott, C. J. Woolf, C. E. Henderson, H. Wichterle and K. Eggan (2011). "A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells." *Nat Biotechnol* **29**(3): 279-286.
- Bounhar, Y., Y. Zhang, C. G. Goodyer and A. LeBlanc (2001). "Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis." *J Biol Chem* **276**(42): 39145-39149.
- Bribian, A., X. Fontana, F. Llorens, R. Gavin, M. Reina, J. M. Garcia-Verdugo, J. M. Torres, F. de Castro and J. A. del Rio (2012). "Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS." *PLoS One* **7**(4): e33872.
- Brown, C. A., C. Schmidt, M. Poulter, H. Hummerich, P. C. Klohn, P. Jat, S. Mead, J. Collinge and S. E. Lloyd (2014). "In vitro screen of prion disease susceptibility genes using the scrapie cell assay." *Hum Mol Genet* **23**(19): 5102-5108.
- Brown, D. R. (2001). "Prion and prejudice: normal protein and the synapse." *Trends Neurosci* **24**(2): 85-90.
- Brown, D. R., B. Schmidt and H. A. Kretzschmar (1998). "A prion protein fragment primes type 1 astrocytes to proliferation signals from microglia." *Neurobiol Dis* **4**(6): 410-422.
- Brown, P., F. Cathala, R. F. Raubertas, D. C. Gajdusek and P. Castaigne (1987). "The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature." *Neurology* **37**(6): 895-904.
- Brown, P., C. J. Gibbs, Jr., P. Rodgers-Johnson, D. M. Asher, M. P. Sulima, A. Bacote, L. G. Goldfarb and D. C. Gajdusek (1994). "Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease." *Ann Neurol* **35**(5): 513-529.
- Browning, S., C. A. Baker, E. Smith, S. P. Mahal, M. E. Herva, C. A. Demczyk, J. Li and C. Weissmann (2011). "Abrogation of complex glycosylation by swainsonine results in strain- and cell-specific inhibition of prion replication." *J Biol Chem* **286**(47): 40962-40973.
- Bruce, M. E. (2003). "TSE strain variation." *Br Med Bull* **66**: 99-108.
- Bruce, M. E., I. McConnell, H. Fraser and A. G. Dickinson (1991). "The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis." *J Gen Virol* **72** (Pt 3): 595-603.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." *Cell* **73**(7): 1339-1347.
- Butler, D. A., M. R. Scott, J. M. Bockman, D. R. Borchelt, A. Taraboulos, K. K. Hsiao, D. T. Kingsbury and S. B. Prusiner (1988). "Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins." *J Virol* **62**(5): 1558-1564.
- Caiazzo, M., M. T. Dell'Anno, E. Dvoretzkova, D. Lazarevic, S. Taverna, D. Leo, T. D. Sotnikova, A. Menegon, P. Roncaglia, G. Colciago, G. Russo, P. Carninci, G. Pezzoli, R. R. Gainetdinov, S. Gustincich, A. Dityatev and V. Broccoli (2011). "Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts." *Nature* **476**(7359): 224-227.
- Capellari, S., R. Strammiello, D. Saverioni, H. Kretzschmar and P. Parchi (2011). "Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis." *Acta Neuropathol* **121**(1): 21-37.

- Cashman, N. R., R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R. J. Kascsak, D. C. Bolton and P. E. Bendheim (1990). "Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation." Cell **61**(1): 185-192.
- Castano, J., P. Menendez, C. Bruzos-Cidon, M. Straccia, A. Sousa, L. Zabaleta, N. Vazquez, A. Zubiarrain, K. C. Sonntag, L. Ugedo, X. Carvajal-Vergara, J. M. Canals, M. Torrecilla, R. Sanchez-Pernaute and A. Giorgetti (2014). "Fast and efficient neural conversion of human hematopoietic cells." Stem Cell Reports **3**(6): 1118-1131.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz and C. Soto (2005). "In vitro generation of infectious scrapie prions." Cell **121**(2): 195-206.
- Caughey, B., K. Brown, G. J. Raymond, G. E. Katzenstein and W. Thresher (1994). "Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected]." J Virol **68**(4): 2135-2141.
- Caughey, B., D. A. Kocisko, G. J. Raymond and P. T. Lansbury, Jr. (1995). "Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state." Chem Biol **2**(12): 807-817.
- Caughey, B. and G. J. Raymond (1991). "The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive." J Biol Chem **266**(27): 18217-18223.
- Caughey, W. S., L. D. Raymond, M. Horiuchi and B. Caughey (1998). "Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12117-12122.
- Cervenakova, L., S. Akimov, I. Vasilyeva, O. Yakovleva, C. McKenzie, J. Cervenak, P. Piccardo and D. M. Asher (2011). "Fukuoka-1 strain of transmissible spongiform encephalopathy agent infects murine bone marrow-derived cells with features of mesenchymal stem cells." Transfusion **51**(8): 1755-1768.
- Cervenakova, L., O. Yakovleva, C. McKenzie, S. Kolchinsky, L. McShane, W. N. Drohan and P. Brown (2003). "Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy." Transfusion **43**(12): 1687-1694.
- Clinton, J., C. Forsyth, M. C. Royston and G. W. Roberts (1993). "Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study." Neuroreport **4**(1): 65-68.
- Cohen, F. E. and S. B. Prusiner (1998). "Pathologic conformations of prion proteins." Annu Rev Biochem **67**: 793-819.
- Colby, D. W. and S. B. Prusiner (2011). "Prions." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(1): a006833.
- Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." Annu Rev Neurosci **24**: 519-550.
- Collinge, J. (2005). "Molecular neurology of prion disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**(7): 906-919.
- Collinge, J. and A. R. Clarke (2007). "A general model of prion strains and their pathogenicity." Science **318**(5852): 930-936.
- Collinge, J., M. S. Palmer, K. C. Sidle, A. F. Hill, I. Gowland, J. Meads, E. Asante, R. Bradley, L. J. Doey and P. L. Lantos (1995). "Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein." Nature **378**(6559): 779-783.
- Collinge, J., K. C. Sidle, J. Meads, J. Ironside and A. F. Hill (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD." Nature **383**(6602): 685-690.
- Collinge, J., J. Whitfield, E. McKintosh, J. Beck, S. Mead, D. J. Thomas and M. P. Alpers (2006). "Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods." Lancet **367**(9528): 2068-2074.
- Collinge, J., M. A. Whittington, K. C. Sidle, C. J. Smith, M. S. Palmer, A. R. Clarke and J. G. Jefferys (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." Nature **370**(6487): 295-297.

- Cortez, L. M., J. Campeau, G. Norman, M. Kalayil, J. Van der Merwe, D. McKenzie and V. L. Sim (2015). "Bile Acids Reduce Prion Conversion, Reduce Neuronal Loss, and Prolong Male Survival in Models of Prion Disease." *J Virol* **89**(15): 7660-7672.
- Cortez, L. M. and V. L. Sim (2013). "Implications of prion polymorphisms." *Prion* **7**(4): 276-279.
- Cowan, C. A., J. Atienza, D. A. Melton and K. Eggan (2005). "Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells." *Science* **309**(5739): 1369-1373.
- Criado, J. R., M. Sanchez-Alavez, B. Conti, J. L. Giacchino, D. N. Wills, S. J. Henriksen, R. Race, J. C. Manson, B. Chesebro and M. B. Oldstone (2005). "Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons." *Neurobiol Dis* **19**(1-2): 255-265.
- Cronier, S., N. Gros, M. H. Tattum, G. S. Jackson, A. R. Clarke, J. Collinge and J. D. Wadsworth (2008). "Detection and characterization of proteinase K-sensitive disease-related prion protein with thermolysin." *Biochem J* **416**(2): 297-305.
- Cronier, S., H. Laude and J. M. Peyrin (2004). "Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(33): 12271-12276.
- Cuillé, J., Chelle, P-L. (1936). "La maladie dite "tremblante du mouton" est-elle inoculable?" *CR Acad Sci, Paris*, **203**: 1552–1554.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer, J. M. Keith and et al. (1985). "Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain." *Nature* **315**(6017): 331-333.
- Choi, B. R., J. Lee, S. Y. Kim, I. Yim, E. H. Kim and H. J. Woo (2013). "Prion protein conversion induced by trivalent iron in vesicular trafficking." *Biochem Biophys Res Commun* **432**(3): 539-544.
- Choi, C. J., A. Kanthasamy, V. Anantharam and A. G. Kanthasamy (2006). "Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases." *Neurotoxicology* **27**(5): 777-787.
- De Lucia, C., A. Rinchon, A. Olmos-Alonso, K. Riecken, B. Fehse, D. Boche, V. H. Perry and D. Gomez-Nicola (2015). "Microglia regulate hippocampal neurogenesis during chronic neurodegeneration." *Brain Behav Immun*.
- DeArmond, S. J. and S. B. Prusiner (2003). "Perspectives on prion biology, prion disease pathogenesis, and pharmacologic approaches to treatment." *Clin Lab Med* **23**(1): 1-41.
- Detwiler, L. A. (1992). "Scrapie." *Rev Sci Tech* **11**(2): 491-537.
- Diaz-Espinoza, R. and C. Soto (2012). "High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier." *Nat Struct Mol Biol* **19**(4): 370-377.
- Dickinson, A. G. (1976). "Scrapie in sheep and goats." *Front Biol* **44**: 209-241.
- Diringer, H., M. Beekes, M. Ozel, D. Simon, I. Queck, F. Cardone, M. Pocchiari and J. W. Ironside (1997). "Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size." *Intervirology* **40**(4): 238-246.
- Dlagic, W. M., E. Grigg and R. A. Bessen (2007). "Prion infection of muscle cells in vitro." *J Virol* **81**(9): 4615-4624.
- Doms, R. W., G. Russ and J. W. Yewdell (1989). "Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* **109**(1): 61-72.
- Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A. G. DeVoe, B. Streeten and D. Cowen (1974). "Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." *N Engl J Med* **290**(12): 692-693.
- Duittoz, A. H. and T. Hevor (2001). "Primary culture of neural precursors from the ovine central nervous system (CNS)." *J Neurosci Methods* **107**(1-2): 131-140.

- Espuny-Camacho, I., K. A. Michelsen, D. Gall, D. Linaro, A. Hasche, J. Bonnefont, C. Bali, D. Orduz, A. Bilheu, A. Herpoel, N. Lambert, N. Gaspard, S. Peron, S. N. Schiffmann, M. Giugliano, A. Gaillard and P. Vanderhaeghen (2013). "Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo." *Neuron* **77**(3): 440-456.
- Falsig, J., C. Julius, I. Margalith, P. Schwarz, F. L. Heppner and A. Aguzzi (2008). "A versatile prion replication assay in organotypic brain slices." *Nat Neurosci* **11**(1): 109-117.
- Falsig, J., T. Sonati, U. S. Herrmann, D. Saban, B. Li, K. Arroyo, B. Ballmer, P. P. Liberski and A. Aguzzi (2012). "Prion pathogenesis is faithfully reproduced in cerebellar organotypic slice cultures." *PLoS Pathog* **8**(11): e1002985.
- Feng, B., J. Jiang, P. Kraus, J. H. Ng, J. C. Heng, Y. S. Chan, L. P. Yaw, W. Zhang, Y. H. Loh, J. Han, V. B. Vega, V. Cacheux-Rataboul, B. Lim, T. Lufkin and H. H. Ng (2009). "Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb." *Nat Cell Biol* **11**(2): 197-203.
- Fevrier, B. and G. Raposo (2004). "Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages." *Curr Opin Cell Biol* **16**(4): 415-421.
- Follet, J., C. Lemaire-Vieille, F. Blanquet-Grossard, V. Podevin-Dimster, S. Lehmann, J. P. Chauvin, J. P. Decavel, R. Varea, J. Grassi, M. Fontes and J. Y. Cesbron (2002). "PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading." *J Virol* **76**(5): 2434-2439.
- Fournier, J. G. (2008). "Cellular prion protein electron microscopy: attempts/limits and clues to a synaptic trait. Implications in neurodegeneration process." *Cell Tissue Res* **332**(1): 1-11.
- Fournier, J. G., F. Escaig-Haye, T. Billette de Villemeur and O. Robain (1995). "Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus." *C R Acad Sci III* **318**(3): 339-344.
- Fournier, J. G., F. Escaig-Haye and V. Grigoriev (2000). "Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications." *Microsc Res Tech* **50**(1): 76-88.
- Fraser, H. and M. Bruce (1973). "Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources." *Lancet* **1**(7803): 617-618.
- Gabizon, R., M. P. McKinley and S. B. Prusiner (1987). "Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(12): 4017-4021.
- Gajdusek, D. C. (1977). "Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru." *Science* **197**(4307): 943-960.
- Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs and M. Alpers (1966). "Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees." *Nature* **209**(5025): 794-796.
- Gajdusek, D. C. and V. Zigas (1957). "Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population." *N Engl J Med* **257**(20): 974-978.
- Gambetti, P., Z. Dong, J. Yuan, X. Xiao, M. Zheng, A. Alsheklee, R. Castellani, M. Cohen, M. A. Barria, D. Gonzalez-Romero, E. D. Belay, L. B. Schonberger, K. Marder, C. Harris, J. R. Burke, T. Montine, T. Wisniewski, D. W. Dickson, C. Soto, C. M. Hulette, J. A. Mastrianni, Q. Kong and W. Q. Zou (2008). "A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease." *Ann Neurol* **63**(6): 697-708.
- Gambetti, P., Q. Kong, W. Zou, P. Parchi and S. G. Chen (2003). "Sporadic and familial CJD: classification and characterisation." *Br Med Bull* **66**: 213-239.
- Gambetti, P., P. Parchi and S. G. Chen (2003). "Hereditary Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia." *Clin Lab Med* **23**(1): 43-64.
- Gardner, D., D. Shoback (2007). *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, McGraw-Hill Companies.
- Gavin, R., N. Braun, O. Nicolas, B. Parra, J. M. Urena, A. Mingorance, E. Soriano, J. M. Torres, A. Aguzzi and J. A. del Rio (2005). "PrP(106-126) activates neuronal intracellular kinases and Egr1 synthesis through activation of NADPH-oxidase independently of PrPc." *FEBS Lett* **579**(19): 4099-4106.

- Ghaemmaghami, S., P. W. Phuan, B. Perkins, J. Ullman, B. C. May, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (2007). "Cell division modulates prion accumulation in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(46): 17971-17976.
- Giaccone, G., G. Di Fede, M. Mangieri, L. Limido, R. Capobianco, S. Suardi, M. Grisoli, S. Binelli, P. Fociani, O. Bugiani and F. Tagliavini (2007). "A novel phenotype of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." J Neuro Neurosurg Psychiatry **78**(12): 1379-1382.
- Gibbs, C. J., Jr., D. C. Gajdusek, D. M. Asher, M. P. Alpers, E. Beck, P. M. Daniel and W. B. Matthews (1968). "Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee." Science **161**(3839): 388-389.
- Giese, A., J. Levin, U. Bertsch and H. Kretschmar (2004). "Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1240-1246.
- Giorgetti, A., M. C. Marchetto, M. Li, D. Yu, R. Fazzina, Y. Mu, A. Adamo, I. Paramonov, J. C. Cardoso, M. B. Monasterio, C. Bardy, R. Cassiani-Ingoni, G. H. Liu, F. H. Gage and J. C. Izpisua Belmonte (2012). "Cord blood-derived neuronal cells by ectopic expression of Sox2 and c-Myc." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(31): 12556-12561.
- Giri, R. K., R. Young, R. Pitstick, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and G. A. Carlson (2006). "Prion infection of mouse neurospheres." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3875-3880.
- Goldfarb, L. G., P. Brown, L. Cervenakova and D. C. Gajdusek (1994). "Genetic analysis of Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **343**(1306): 379-384.
- Gomes, M. P., T. C. Vieira, Y. Cordeiro and J. L. Silva (2012). "The role of RNA in mammalian prion protein conversion." Wiley Interdiscip Rev RNA **3**(3): 415-428.
- Gonzalez, F., S. Boue and J. C. Izpisua Belmonte (2011). "Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte." Nat Rev Genet **12**(4): 231-242.
- Goold, R., S. Rabbanian, L. Sutton, R. Andre, P. Arora, J. Moonga, A. R. Clarke, G. Schiavo, P. Jat, J. Collinge and S. J. Tabrizi (2011). "Rapid cell-surface prion protein conversion revealed using a novel cell system." Nat Commun **2**: 281.
- Gough, K. C. and B. C. Maddison (2010). "Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment." Prion **4**(4): 275-282.
- Gousset, K., E. Schiff, C. Langevin, Z. Marijanovic, A. Caputo, D. T. Browman, N. Chenouard, F. de Chaumont, A. Martino, J. Enninga, J. C. Olivo-Marin, D. Mannel and C. Zurzolo (2009). "Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread." Nat Cell Biol **11**(3): 328-336.
- Gousset, K. and C. Zurzolo (2009). "Tunnelling nanotubes: a highway for prion spreading?" Prion **3**(2): 94-98.
- Graner, E., A. F. Mercadante, S. M. Zanata, O. V. Forlenza, A. L. Cabral, S. S. Veiga, M. A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V. R. Martins and R. R. Brentani (2000). "Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis." Brain Res Mol Brain Res **76**(1): 85-92.
- Grassmann, A., H. Wolf, J. Hofmann, J. Graham and I. Vorberg (2013). "Cellular aspects of prion replication in vitro." Viruses **5**(1): 374-405.
- Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and scrapie." Nature **215**(5105): 1043-1044.
- Guenther, M. G., G. M. Frampton, F. Soldner, D. Hockemeyer, M. Mitalipova, R. Jaenisch and R. A. Young (2010). "Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **7**(2): 249-257.
- Gurdon, J. B. (2013). "The cloning of a frog." Development **140**(12): 2446-2448.
- Hadlow, W. J., R. C. Kennedy and R. E. Race (1982). "Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus." J Infect Dis **146**(5): 657-664.

- Han, D. W., N. Tapia, A. Hermann, K. Hemmer, S. Hoing, M. J. Arauzo-Bravo, H. Zaehres, G. Wu, S. Frank, S. Moritz, B. Greber, J. H. Yang, H. T. Lee, J. C. Schwamborn, A. Storch and H. R. Scholer (2012). "Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors." *Cell Stem Cell* **10**(4): 465-472.
- Hannaoui, S., L. Maatouk, N. Privat, E. Levavasseur, B. A. Faucheux and S. Haik (2013). "Prion propagation and toxicity occur in vitro with two-phase kinetics specific to strain and neuronal type." *J Virol* **87**(5): 2535-2548.
- Harris, D. A. (1999). "Cellular biology of prion diseases." *Clin Microbiol Rev* **12**(3): 429-444.
- Harris, D. A., M. T. Huber, P. van Dijken, S. L. Shyng, B. T. Chait and R. Wang (1993). "Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites." *Biochemistry* **32**(4): 1009-1016.
- Haybaeck, J., M. Heikenwalder, B. Klevenz, P. Schwarz, I. Margalith, C. Bridel, K. Mertz, E. Zirdum, B. Petsch, T. J. Fuchs, L. Stitz and A. Aguzzi (2011). "Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice." *PLoS Pathog* **7**(1): e1001257.
- Head, M. W., S. Lowrie, G. Chohan, R. Knight, D. J. Scoones and J. W. Ironside (2010). "Variably protease-sensitive prionopathy in a PRNP codon 129 heterozygous UK patient with co-existing tau, alpha synuclein and Abeta pathology." *Acta Neuropathol* **120**(6): 821-823.
- Head, M. W., H. M. Yull, D. L. Ritchie, J. P. Langeveld, N. A. Fletcher, R. S. Knight and J. W. Ironside (2013). "Variably protease-sensitive prionopathy in the UK: a retrospective review 1991-2008." *Brain* **136**(Pt 4): 1102-1115.
- Heinrich, C., R. Blum, S. Gascon, G. Masserdotti, P. Tripathi, R. Sanchez, S. Tiedt, T. Schroeder, M. Gotz and B. Berninger (2010). "Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons." *PLoS Biol* **8**(5): e1000373.
- Heinrich, C., S. Gascon, G. Masserdotti, A. Lepier, R. Sanchez, T. Simon-Ebert, T. Schroeder, M. Gotz and B. Berninger (2011). "Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex." *Nat Protoc* **6**(2): 214-228.
- Heins, N., P. Malatesta, F. Cecconi, M. Nakafuku, K. L. Tucker, M. A. Hack, P. Chapouton, Y. A. Barde and M. Gotz (2002). "Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6." *Nat Neurosci* **5**(4): 308-315.
- Heng, J. C., B. Feng, J. Han, J. Jiang, P. Kraus, J. H. Ng, Y. L. Orlov, M. Huss, L. Yang, T. Lufkin, B. Lim and H. H. Ng (2010). "The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells." *Cell Stem Cell* **6**(2): 167-174.
- Herbst, A., P. Banser, C. D. Velasquez, C. E. Mays, V. L. Sim, D. Westaway, J. M. Aiken and D. McKenzie (2013). "Infectious prions accumulate to high levels in non proliferative C2C12 myotubes." *PLoS Pathog* **9**(11): e1003755.
- Herms, J., T. Tings, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schurmann, O. Windl, N. Brose and H. Kretzschmar (1999). "Evidence of presynaptic location and function of the prion protein." *J Neurosci* **19**(20): 8866-8875.
- Hernandez, R. S., R. Sarasa, A. Toledano, J. J. Badiola and M. Monzon (2014). "Morphological approach to assess the involvement of astrocytes in prion propagation." *Cell Tissue Res* **358**(1): 57-63.
- Herva, M. E., A. Relano-Gines, A. Villa and J. M. Torres (2010). "Prion infection of differentiated neurospheres." *J Neurosci Methods* **188**(2): 270-275.
- Hijazi, N., Y. Shaked, H. Rosenmann, T. Ben-Hur and R. Gabizon (2003). "Copper binding to PrPC may inhibit prion disease propagation." *Brain Res* **993**(1-2): 192-200.
- Hill, A. F., M. Desbruslais, S. Joiner, K. C. Sidle, I. Gowland, J. Collinge, L. J. Doey and P. Lantos (1997). "The same prion strain causes vCJD and BSE." *Nature* **389**(6650): 448-450, 526.
- Hollister, J. R., K. S. Lee, D. W. Dorward and G. S. Baron (2015). "Efficient uptake and dissemination of scrapie prion protein by astrocytes and fibroblasts from adult hamster brain." *PLoS One* **10**(1): e0115351.

- Hornabrook, R. W. (1968). "Kuru--a subacute cerebellar degeneration. The natural history and clinical features." Brain **91**(1): 53-74.
- Hsiao, K., H. F. Baker, T. J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J. D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott and S. B. Prusiner (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome." Nature **338**(6213): 342-345.
- Huangfu, D., K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein and D. A. Melton (2008). "Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2." Nat Biotechnol **26**(11): 1269-1275.
- Huber, R., T. Deboer and I. Tobler (1999). "Prion protein: a role in sleep regulation?" J Sleep Res **8 Suppl 1**: 30-36.
- Hugel, B., M. C. Martinez, C. Kunzelmann, T. Blattler, A. Aguzzi and J. M. Freyssinet (2004). "Modulation of signal transduction through the cellular prion protein is linked to its incorporation in lipid rafts." Cell Mol Life Sci **61**(23): 2998-3007.
- Huillard d'Aignaux, J. N., S. N. Cousens, J. Maccario, D. Costagliola, M. P. Alpers, P. G. Smith and A. Alperovitch (2002). "The incubation period of kuru." Epidemiology **13**(4): 402-408.
- Imran, M. and S. Mahmood (2011a). "An overview of animal prion diseases." Virology **8**: 493.
- Imran, M. and S. Mahmood (2011b). "An overview of human prion diseases." Virology **8**: 559.
- Ironside, J. W. (1996). "Review: Creutzfeldt-Jakob disease." Brain Pathol **6**(4): 379-388.
- Ironside, J. W., M. W. Head, L. McCardle and R. Knight (2002). "Neuropathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease." Acta Neurobiol Exp (Wars) **62**(3): 175-182.
- Iwamaru, Y., T. Takenouchi, M. Imamura, Y. Shimizu, K. Miyazawa, S. Mohri, T. Yokoyama and H. Kitani (2013). "Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures." J Virol **87**(15): 8745-8755.
- Iwamaru, Y., T. Takenouchi, K. Ogihara, M. Hoshino, M. Takata, M. Imamura, Y. Tagawa, H. Hayashi-Kato, Y. Ushiki-Kaku, Y. Shimizu, H. Okada, M. Shinagawa, H. Kitani and T. Yokoyama (2007). "Microglial cell line established from prion protein-overexpressing mice is susceptible to various murine prion strains." J Virol **81**(3): 1524-1527.
- Jackson, G. S., I. Murray, L. L. Hosszu, N. Gibbs, J. P. Waltho, A. R. Clarke and J. Collinge (2001). "Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8531-8535.
- Jarius, C., G. G. Kovacs, G. Belay, J. A. Hainfellner, E. Mitrova and H. Budka (2003). "Distinctive cerebellar immunoreactivity for the prion protein in familial (E200K) Creutzfeldt-Jakob disease." Acta Neuropathol **105**(5): 449-454.
- Jeffrey, M., I. A. Goodbrand and C. M. Goodsir (1995). "Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure." Micron **26**(3): 277-298.
- Jeffrey, M. and G. A. Wells (1988). "Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*)." Vet Pathol **25**(5): 398-399.
- Jeong, B. H. and Y. S. Kim (2014). "Genetic studies in human prion diseases." J Korean Med Sci **29**(5): 623-632.
- Jin, K., Y. Sun, L. Xie, A. Peel, X. O. Mao, S. Bateur and D. A. Greenberg (2003). "Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum." Mol Cell Neurosci **24**(1): 171-189.
- Kanu, N., Y. Imokawa, D. N. Drechsel, R. A. Williamson, C. R. Birkett, C. J. Bostock and J. P. Brockes (2002). "Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture." Curr Biol **12**(7): 523-530.
- Karow, M., R. Sanchez, C. Schichor, G. Masserdotti, F. Ortega, C. Heinrich, S. Gascon, M. A. Khan, D. C. Lie, A. Dellavalle, G. Cossu, R. Goldbrunner, M. Gotz and B. Berninger (2012). "Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells." Cell Stem Cell **11**(4): 471-476.

- Kaul, M., G. A. Garden and S. A. Lipton (2001). "Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia." Nature **410**(6831): 988-994.
- Keshet, G. I., O. Bar-Peled, D. Yaffe, U. Nudel and R. Gabizon (2000). "The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain." J Neurochem **75**(5): 1889-1897.
- Khosravani, H., Y. Zhang, S. Tsutsui, S. Hameed, C. Altier, J. Hamid, L. Chen, M. Villemaire, Z. Ali, F. R. Jirik and G. W. Zamponi (2008). "Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors." J Gen Physiol **131**(6): i5.
- Kim, B. H., J. I. Kim, E. K. Choi, R. I. Carp and Y. S. Kim (2005). "A neuronal cell line that does not express either prion or doppel proteins." Neuroreport **16**(5): 425-429.
- Kim, J., S. C. Su, H. Wang, A. W. Cheng, J. P. Cassady, M. A. Lodato, C. J. Lengner, C. Y. Chung, M. M. Dawlaty, L. H. Tsai and R. Jaenisch (2011). "Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts." Cell Stem Cell **9**(5): 413-419.
- Kim, J. B., B. Greber, M. J. Arauzo-Bravo, J. Meyer, K. I. Park, H. Zaehres and H. R. Scholer (2009). "Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4." Nature **461**(7264): 649-643.
- Kim, N. H., J. K. Choi, B. H. Jeong, J. I. Kim, M. S. Kwon, R. I. Carp and Y. S. Kim (2005). "Effect of transition metals (Mn, Cu, Fe) and deoxycholic acid (DA) on the conversion of PrPC to PrPres." Faseb J **19**(7): 783-785.
- Kimberlin, R. H., S. Cole and C. A. Walker (1987). "Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters." J Gen Virol **68 (Pt 7)**: 1875-1881.
- Kimberlin, R. H., C. A. Walker and H. Fraser (1989). "The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice." J Gen Virol **70 (Pt 8)**: 2017-2025.
- Kirkwood, J. K., G. A. Wells, J. W. Wilesmith, A. A. Cunningham and S. I. Jackson (1990). "Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*)." Vet Rec **127**(17): 418-420.
- Kitamoto, T., T. Muramoto, S. Mohri, K. Doh-Ura and J. Tateishi (1991). "Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease." J Virol **65**(11): 6292-6295.
- Kittelberger, R., M. J. Chaplin, M. M. Simmons, A. Ramirez-Villaescusa, L. McIntyre, S. C. MacDiarmid, M. J. Hannah, J. Jenner, R. Bueno, D. Bayliss, H. Black, C. J. Pigott and J. S. O'Keefe (2010). "Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand." J Vet Diagn Invest **22**(6): 863-875.
- Knight, R. S. and R. G. Will (2004). "Prion diseases." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75 Suppl 1**: i36-42.
- Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury and B. Caughey (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." Nature **370**(6489): 471-474.
- Kovacs, G. G. and H. Budka (2008). "Prion diseases: from protein to cell pathology." Am J Pathol **172**(3): 555-565.
- Kovacs, G. G. and H. Budka (2009). "Molecular pathology of human prion diseases." Int J Mol Sci **10**(3): 976-999.
- Kovacs, G. G., M. Puopolo, A. Ladogana, M. Pocchiari, H. Budka, C. van Duijn, S. J. Collins, A. Boyd, A. Giulivi, M. Coulthart, N. Delasnerie-Laupretre, J. P. Brandel, I. Zerr, H. A. Kretzschmar, J. de Pedro-Cuesta, M. Calero-Lara, M. Glatzel, A. Aguzzi, M. Bishop, R. Knight, G. Belay, R. Will and E. Mitrova (2005). "Genetic prion disease: the EUROCDJ experience." Hum Genet **118**(2): 166-174.
- Kraus, A., B. R. Groveman and B. Caughey (2013). "Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases." Annu Rev Microbiol **67**: 543-564.
- Krejciova, Z., S. Pells, E. Cancellotti, P. Freile, M. Bishop, K. Samuel, G. R. Barclay, J. W. Ironside, J. C. Manson, M. L. Turner, P. De Sousa and M. W. Head (2011). "Human embryonic stem cells rapidly take up and then clear exogenous human and animal prions in vitro." J Pathol **223**(5): 635-645.

- Ladewig, J., P. Koch and O. Brustle (2013). "Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(4): 225-236.
- Laude, H., D. Vilette, A. Le Dur, F. Archer, S. Soulier, N. Besnard, R. Essalmani and J. L. Vilotte (2002). "New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives." C R Biol **325**(1): 49-57.
- Lazarini, F., J. P. Deslys and D. Dormont (1991). "Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse." Brain Res Mol Brain Res **10**(4): 343-346.
- Lee, Y. J. and I. V. Baskakov (2010). "Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells." J Neurochem **114**(2): 362-373.
- Legname, G., H. O. Nguyen, D. Peretz, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (2006). "Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19105-19110.
- Leiderman, D. B., K. P. Decker, J. Borcich and D. W. Choi (1986). "Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in two coworkers." Neurology **36**(6): 835-837.
- Lewis, V. and N. M. Hooper (2011). "The role of lipid rafts in prion protein biology." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 151-168.
- Liang, J., Y. Pan, D. Zhang, C. Guo, Y. Shi, J. Wang, Y. Chen, X. Wang, J. Liu, X. Guo, Z. Chen, T. Qiao and D. Fan (2007). "Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS." Faseb J **21**(9): 2247-2256.
- Liberski, P. P. (1986). "Gliocytosis in experimental scrapie (263K strain of scrapie) in golden Syrian hamsters." Neuropatol Pol **24**(2): 221-230.
- Liberski, P. P. (2012). "Historical overview of prion diseases: a view from afar." Folia Neuropathol **50**(1): 1-12.
- Liberski, P. P. and H. Budka (2004). "Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. I. Human diseases." Folia Neuropathol **42 Suppl B**: 120-140.
- Linden, R., V. R. Martins, M. A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo and R. R. Brentani (2008). "Physiology of the prion protein." Physiol Rev **88**(2): 673-728.
- Liu, X., F. Li, E. A. Stubblefield, B. Blanchard, T. L. Richards, G. A. Larson, Y. He, Q. Huang, A. C. Tan, D. Zhang, T. A. Benke, J. R. Sladek, N. R. Zahniser and C. Y. Li (2012). "Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells." Cell Res **22**(2): 321-332.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Loubet, D., C. Dakowski, M. Pietri, E. Pradines, S. Bernard, J. Callebert, H. Ardila-Osorio, S. Mouillet-Richard, J. M. Launay, O. Kellermann and B. Schneider (2012). "Neuritogenesis: the prion protein controls beta1 integrin signaling activity." Faseb J **26**(2): 678-690.
- Ludlam, C. A. and M. L. Turner (2006). "Managing the risk of transmission of variant Creutzfeldt Jakob disease by blood products." Br J Haematol **132**(1): 13-24.
- Lugaresi, E., R. Medori, P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, A. Lugaresi, P. Tinuper, M. Zucconi and P. Gambetti (1986). "Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei." N Engl J Med **315**(16): 997-1003.
- Lujan, E., S. Chanda, H. Ahlenius, T. C. Sudhof and M. Wernig (2012). "Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(7): 2527-2532.
- Ma, J. and S. Lindquist (2001). "Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14955-14960.
- Mabbott, N. A. and M. E. Bruce (2001). "The immunobiology of TSE diseases." J Gen Virol **82**(Pt 10): 2307-2318.

- Mabbott, N. A. and G. G. MacPherson (2006). "Prions and their lethal journey to the brain." Nat Rev Microbiol **4**(3): 201-211.
- Maglio, L. E., M. F. Perez, V. R. Martins, R. R. Brentani and O. A. Ramirez (2004). "Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein." Brain Res Mol Brain Res **131**(1-2): 58-64.
- Mahal, S. P., C. A. Baker, C. A. Demczyk, E. W. Smith, C. Julius and C. Weissmann (2007). "Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20908-20913.
- Maherali, N., R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath and K. Hochedlinger (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." Cell Stem Cell **1**(1): 55-70.
- Manetto, V., R. Medori, P. Cortelli, P. Montagna, P. Tinuper, A. Baruzzi, G. Rancurel, J. J. Hauw, J. J. Vanderhaeghen, P. Mailloux and et al. (1992). "Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases." Neurology **42**(2): 312-319.
- Manson, J., J. D. West, V. Thomson, P. McBride, M. H. Kaufman and J. Hope (1992). "The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?" Development **115**(1): 117-122.
- Manuelidis, L., D. M. Tesin, T. Sklaviadis and E. E. Manuelidis (1987). "Astrocyte gene expression in Creutzfeldt-Jakob disease." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5937-5941.
- Marella, M., S. Lehmann, J. Grassi and J. Chabry (2002). "Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release." J Biol Chem **277**(28): 25457-25464.
- Marijanovic, Z., A. Caputo, V. Campana and C. Zurzolo (2009). "Identification of an intracellular site of prion conversion." PLoS Pathog **5**(5): e1000426.
- Marro, S., Z. P. Pang, N. Yang, M. C. Tsai, K. Qu, H. Y. Chang, T. C. Sudhof and M. Wernig (2011). "Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons." Cell Stem Cell **9**(4): 374-382.
- Marsh, R. F. and W. J. Hadlow (1992). "Transmissible mink encephalopathy." Rev Sci Tech **11**(2): 539-550.
- Masel, J. and V. A. Jansen (2001). "The measured level of prion infectivity varies in a predictable way according to the aggregation state of the infectious agent." Biochim Biophys Acta **1535**(2): 164-173.
- Masel, J., V. A. Jansen and M. A. Nowak (1999). "Quantifying the kinetic parameters of prion replication." Biophys Chem **77**(2-3): 139-152.
- Masip, M., A. Veiga, J. C. Izpisua Belmonte and C. Simon (2010). "Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation." Mol Hum Reprod **16**(11): 856-868.
- Mastrianni, J. A. (2010). "The genetics of prion diseases." Genet Med **12**(4): 187-195.
- Mastrianni, J. A., R. Nixon, R. Layzer, G. C. Telling, D. Han, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1999). "Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia." N Engl J Med **340**(21): 1630-1638.
- Mattei, V., M. G. Barenco, V. Tasciotti, T. Garofalo, A. Longo, K. Boller, J. Lower, R. Misasi, F. Montrasio and M. Sorice (2009). "Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles." PLoS One **4**(4): e5057.
- McBride, P. A., W. J. Schulz-Schaeffer, M. Donaldson, M. Bruce, H. Diringer, H. A. Kretzschmar and M. Beekes (2001). "Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves." J Virol **75**(19): 9320-9327.
- McKinley, M. P., M. B. Braunfeld, C. G. Bellinger and S. B. Prusiner (1986). "Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains." J Infect Dis **154**(1): 110-120.
- McKinley, M. P., B. Hay, V. R. Lingappa, I. Lieberburg and S. B. Prusiner (1987). "Developmental expression of prion protein gene in brain." Dev Biol **121**(1): 105-110.

- Mead, S., M. P. Stumpf, J. Whitfield, J. A. Beck, M. Poulter, T. Campbell, J. B. Uphill, D. Goldstein, M. Alpers, E. M. Fisher and J. Collinge (2003). "Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics." *Science* **300**(5619): 640-643.
- Mead, S., J. Whitfield, M. Poulter, P. Shah, J. Uphill, T. Campbell, H. Al-Dujaily, H. Hummerich, J. Beck, C. A. Mein, C. Verzilli, J. Whittaker, M. P. Alpers and J. Collinge (2009). "A novel protective prion protein variant that colocalizes with kuru exposure." *N Engl J Med* **361**(21): 2056-2065.
- Mediano, D. R., D. Sanz-Rubio, R. Bolea, B. Marin, F. J. Vasquez, A. R. Remacha, O. Lopez-Perez, N. Fernandez-Borges, J. Castilla, P. Zaragoza, J. J. Badiola, C. Rodellar and I. Martin-Burriel (2015). "Characterization of Mesenchymal Stem Cells in sheep naturally infected with scrapie." *J Gen Virol*.
- Medori, R., H. J. Tritschler, A. LeBlanc, F. Villare, V. Manetto, H. Y. Chen, R. Xue, S. Leal, P. Montagna, P. Cortelli and et al. (1992). "Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene." *N Engl J Med* **326**(7): 444-449.
- Meyer, R. K., M. P. McKinley, K. A. Bowman, M. B. Braunfeld, R. A. Barry and S. B. Prusiner (1986). "Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2310-2314.
- Michelsen, K. A., S. Acosta-Verdugo, M. Benoit-Marand, I. Espuny-Camacho, N. Gaspard, B. Saha, A. Gaillard and P. Vanderhaeghen (2015). "Area-specific reestablishment of damaged circuits in the adult cerebral cortex by cortical neurons derived from mouse embryonic stem cells." *Neuron* **85**(5): 982-997.
- Miele, G., A. R. Alejo Blanco, H. Baybutt, S. Horvat, J. Manson and M. Clinton (2003). "Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene." *Gene Expr* **11**(1): 1-12.
- Mikkelsen, T. S., J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, E. S. Lander and A. Meissner (2008). "Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis." *Nature* **454**(7200): 49-55.
- Milhavet, O., D. Casanova, N. Chevallier, R. D. McKay and S. Lehmann (2006). "Neural stem cell model for prion propagation." *Stem Cells* **24**(10): 2284-2291.
- Misumi, Y., Y. Misumi, K. Miki, A. Takatsuki, G. Tamura and Y. Ikehara (1986). "Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes." *J Biol Chem* **261**(24): 11398-11403.
- Montagna, P., P. Gambetti, P. Cortelli and E. Lugaresi (2003). "Familial and sporadic fatal insomnia." *Lancet Neurol* **2**(3): 167-176.
- Moore, S., L. D. Evans, T. Andersson, E. Portelius, J. Smith, T. B. Dias, N. Saurat, A. McGlade, P. Kirwan, K. Blennow, J. Hardy, H. Zetterberg and F. J. Livesey (2015). "APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons." *Cell Rep* **11**(5): 689-696.
- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay and O. Kellermann (2000). "Signal transduction through prion protein." *Science* **289**(5486): 1925-1928.
- Moya, K. L., N. Sales, R. Hassig, C. Creminon, J. Grassi and L. Di Giamberardino (2000). "Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain." *Microsc Res Tech* **50**(1): 58-65.
- Muhleisen, H., J. Gehrman and R. Meyermann (1995). "Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* **21**(6): 505-517.
- Mungenast, A. E., S. Siegert and L. H. Tsai (2015). "Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells." *Mol Cell Neurosci*.
- Munoz-Gutierrez, J. F., S. Aguilar Pierle, D. A. Schneider, T. V. Baszler and J. B. Stanton (2016). "Transcriptomic Determinants of Scrapie Prion Propagation in Cultured Ovine Microglia." *PLoS One* **11**(1): e0147727.
- Munoz-Gutierrez, J. F., D. A. Schneider, T. V. Baszler, J. J. Greenlee, E. M. Nicholson and J. B. Stanton (2015). "hTERT-immortalized ovine microglia propagate natural scrapie isolates." *Virus Res* **198**: 35-43.

- Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa and S. Yamanaka (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." Nat Biotechnol **26**(1): 101-106.
- Nishida, N., D. A. Harris, D. Vilette, H. Laude, Y. Frobert, J. Grassi, D. Casanova, O. Milhabet and S. Lehmann (2000). "Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein." J Virol **74**(1): 320-325.
- Nishida, N., S. Katamine and L. Manuelidis (2005). "Reciprocal interference between specific CJD and scrapie agents in neural cell cultures." Science **310**(5747): 493-496.
- Oelschlegel, A. M., M. Geissen, M. Lenk, R. Riebe, M. Angermann, H. Schatzl and M. H. Groschup (2015). "A bovine cell line that can be infected by natural sheep scrapie prions." PLoS One **10**(1): e0117154.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood and et al. (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**(4): 735-746.
- Okita, K., T. Ichisaka and S. Yamanaka (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." Nature **448**(7151): 313-317.
- Owen, F., M. Poulter, J. Collinge and T. J. Crow (1990). "Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians." Am J Hum Genet **46**(6): 1215-1216.
- Pan, K. M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen and et al. (1993). "Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10962-10966.
- Pang, Z. P., N. Yang, T. Vierbuchen, A. Ostermeier, D. R. Fuentes, T. Q. Yang, A. Citri, V. Sebastiano, S. Marro, T. C. Sudhof and M. Wernig (2011). "Induction of human neuronal cells by defined transcription factors." Nature **476**(7359): 220-223.
- Pantera, B., C. Bini, P. Cirri, P. Paoli, G. Camici, G. Manao and A. Caselli (2009). "PrP^{Sc} activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells: role for caveolin-1 in the signal transduction pathway." J Neurochem **110**(1): 194-207.
- Paquet, S., C. Langevin, J. Chapuis, G. S. Jackson, H. Laude and D. Vilette (2007). "Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells." J Gen Virol **88**(Pt 2): 706-713.
- Parchi, P., S. Capellari, S. Chin, H. B. Schwarz, N. P. Schechter, J. D. Butts, P. Hudkins, D. K. Burns, J. M. Powers and P. Gambetti (1999). "A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia." Neurology **52**(9): 1757-1763.
- Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S. G. Chen, M. Farlow, D. W. Dickson, A. A. Sima, J. Q. Trojanowski, R. B. Petersen and P. Gambetti (1996). "Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." Ann Neurol **39**(6): 767-778.
- Parchi, P., S. G. Chen, P. Brown, W. Zou, S. Capellari, H. Budka, J. Hainfellner, P. F. Reyes, G. T. Golden, J. J. Hauw, D. C. Gajdusek and P. Gambetti (1998). "Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8322-8327.
- Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. Schulz-Schaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti and H. Kretzschmar (1999). "Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects." Ann Neurol **46**(2): 224-233.
- Pauly, P. C. and D. A. Harris (1998). "Copper stimulates endocytosis of the prion protein." J Biol Chem **273**(50): 33107-33110.
- Pergami, P., H. Jaffe and J. Safar (1996). "Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form." Anal Biochem **236**(1): 63-73.

- Pfisterer, U., A. Kirkeby, O. Torper, J. Wood, J. Nelander, A. Dufour, A. Bjorklund, O. Lindvall, J. Jakobsson and M. Parmar (2011). "Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(25): 10343-10348.
- Pfisterer, U., J. Wood, K. Nihlberg, O. Hallgren, L. Bjermer, G. Westergren-Thorsson, O. Lindvall and M. Parmar (2011). "Efficient induction of functional neurons from adult human fibroblasts." Cell Cycle **10**(19): 3311-3316.
- Piccardo, P., S. R. Dlouhy, P. M. Lievens, K. Young, T. D. Bird, D. Nochlin, D. W. Dickson, H. V. Vinters, T. R. Zimmerman, I. R. Mackenzie, S. J. Kish, L. C. Ang, C. De Carli, M. Pocchiari, P. Brown, C. J. Gibbs, Jr., D. C. Gajdusek, O. Bugiani, J. Ironside, F. Tagliavini and B. Ghetti (1998). "Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity." J Neuropathol Exp Neurol **57**(10): 979-988.
- Piccardo, P., J. J. Liepnieks, A. William, S. R. Dlouhy, M. R. Farlow, K. Young, D. Nochlin, T. D. Bird, R. R. Nixon, M. J. Ball, C. DeCarli, O. Bugiani, F. Tagliavini, M. D. Benson and B. Ghetti (2001). "Prion proteins with different conformations accumulate in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease caused by A117V and F198S mutations." Am J Pathol **158**(6): 2201-2207.
- Pickering, S. J., S. L. Minger, M. Patel, H. Taylor, C. Black, C. J. Burns, A. Ekonomou and P. R. Braude (2005). "Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis." Reprod Biomed Online **10**(3): 390-397.
- Pinel, G., E. G. Montero, M. Morlan, B. Martinez, R. Aladro, J. Mendoza, Pedro-Cuesta and M. Calero (2011). "Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética fulminante asociada a mutación E200K y polimorfismo M129V." Neurología Argentina **3**(4): 210-213.
- Pirsinu, L., R. Nonno, E. Esposito, S. L. Benestad, P. Gambetti, U. Agrimi and W. Q. Zou (2013). "Small ruminant nor98 prions share biochemical features with human gerstmann-straussler-scheinker disease and variably protease-sensitive prionopathy." PLoS One **8**(6): e66405.
- Ponz, R., L. V. Monteagudo and M. V. Arruga (2002). "Identificación de la resistencia osensibilidad al Scrapie ovino." Albeitar(52): 36-38.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**(4542): 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." Science **252**(5012): 1515-1522.
- Prusiner, S. B. (1998). "Prions." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13363-13383.
- Prusiner, S. B., M. P. McKinley, K. A. Bowman, D. C. Bolton, P. E. Bendheim, D. F. Groth and G. G. Glenner (1983). "Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods." Cell **35**(2 Pt 1): 349-358.
- Prusiner, S. B., M. Scott, D. Foster, K. M. Pan, D. Groth, C. Mirenda, M. Torchia, S. L. Yang, D. Serban, G. A. Carlson and et al. (1990). "Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication." Cell **63**(4): 673-686.
- Pulford, B., N. Reim, A. Bell, J. Veatch, G. Forster, H. Bender, C. Meyerett, S. Hafeman, B. Michel, T. Johnson, A. C. Wyckoff, G. Miele, C. Julius, J. Kranich, A. Schenkel, S. Dow and M. D. Zabel (2010). "Liposome-siRNA-peptide complexes cross the blood-brain barrier and significantly decrease PrP on neuronal cells and PrP in infected cell cultures." PLoS One **5**(6): e11085.
- Rabano, A., J. de Pedro-Cuesta, K. Molbak, A. Siden, M. Calero and H. Laursen (2005). "Tissue classification for the epidemiological assessment of surgical transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. A proposal on hypothetical risk levels." BMC Public Health **5**: 9.
- Race, R. E., B. Caughey, K. Graham, D. Ernst and B. Chesebro (1988). "Analyses of frequency of infection, specific infectivity, and prion protein biosynthesis in scrapie-infected neuroblastoma cell clones." J Virol **62**(8): 2845-2849.
- Race, R. E., L. H. Fadness and B. Chesebro (1987). "Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells." J Gen Virol **68 (Pt 5)**: 1391-1399.

- Rajendran, L., V. Udayar and Z. V. Goodger (2012). "Lipid-anchored drugs for delivery into subcellular compartments." *Trends Pharmacol Sci* **33**(4): 215-222.
- Rana, A., D. Gnaneswari, S. Bansal and B. Kundu (2009). "Prion metal interaction: is prion pathogenesis a cause or a consequence of metal imbalance?" *Chem Biol Interact* **181**(3): 282-291.
- Rangel, A., F. Burgaya, R. Gavin, E. Soriano, A. Aguzzi and J. A. Del Rio (2007). "Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors." *J Neurosci Res* **85**(12): 2741-2755.
- Rangel, A., N. Madronal, A. Gruart, R. Gavin, F. Llorens, L. Sumoy, J. M. Torres, J. M. Delgado-Garcia and J. A. Del Rio (2009). "Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice." *PLoS One* **4**(10): e7592.
- Raya, A., I. Rodriguez-Piza, G. Guenechea, R. Vassena, S. Navarro, M. J. Barrero, A. Consiglio, M. Castella, P. Rio, E. Sleep, F. Gonzalez, G. Tiscornia, E. Garreta, T. Aasen, A. Veiga, I. M. Verma, J. Surralles, J. Bueren and J. C. Izpisua Belmonte (2009). "Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells." *Nature* **460**(7251): 53-59.
- Raya, A., I. Rodriguez-Piza, S. Navarro, Y. Richaud-Patin, G. Guenechea, A. Sanchez-Danes, A. Consiglio, J. Bueren and J. C. Izpisua Belmonte (2010). "A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPSC cells." *Nat Protoc* **5**(4): 647-660.
- Relano-Gines, A., S. Lehmann, A. Bencsik, M. E. Herva, J. M. Torres and C. A. Crozet (2013). "Stem cell therapy extends incubation and survival time in prion-infected mice in a time window-dependant manner." *J Infect Dis* **204**(7): 1038-1045.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* **255**(5052): 1707-1710.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber and K. Wuthrich (1996). "NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)." *Nature* **382**(6587): 180-182.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber and K. Wuthrich (1997). "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)." *FEBS Lett* **413**(2): 282-288.
- Rodriguez-Martinez, A. B., J. M. Garrido, J. J. Zarranz, J. M. Arteagoitia, M. M. de Pancorbo, B. Atares, M. J. Bilbao, I. Ferrer and R. A. Juste (2010). "A novel form of human disease with a protease-sensitive prion protein and heterozygosity methionine/valine at codon 129: Case report." *BMC Neurol* **10**: 99.
- Rubenstein, R., H. Deng, C. L. Scalici and M. C. Papini (1991). "Alterations in neurotransmitter-related enzyme activity in scrapie-infected PC12 cells." *J Gen Virol* **72** (Pt 6): 1279-1285.
- Rustom, A., R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther and H. H. Gerdes (2004). "Nanotubular highways for intercellular organelle transport." *Science* **303**(5660): 1007-1010.
- Saborio, G. P., B. Permanne and C. Soto (2001). "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." *Nature* **411**(6839): 810-813.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1998). "Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations." *Nat Med* **4**(10): 1157-1165.
- Sales, N., R. Hassig, K. Rodolfo, L. Di Giamberardino, E. Traiffort, M. Ruat, P. Fretier and K. L. Moya (2002). "Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons." *Eur J Neurosci* **15**(7): 1163-1177.
- Sales, N., K. Rodolfo, R. Hassig, B. Faucheux, L. Di Giamberardino and K. L. Moya (1998). "Cellular prion protein localization in rodent and primate brain." *Eur J Neurosci* **10**(7): 2464-2471.
- Sances, S., L. I. Bruijn, S. Chandran, K. Egan, R. Ho, J. R. Klim, M. R. Livesey, E. Lowry, J. D. Macklis, D. Rushton, C. Sadegh, D. Sareen, H. Wichterle, S. C. Zhang and C. N. Svendsen (2016). "Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells." *Nat Neurosci* **16**(4): 542-553.

- Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyns'ka and M. Schachner (2005). "Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth." J Cell Biol **169**(2): 341-354.
- Sarasa, R., A. Martinez, E. Monleon, R. Bolea, A. Vargas, J. J. Badiola and M. Monzon (2012). "Involvement of astrocytes in transmissible spongiform encephalopathies: a confocal microscopy study." Cell Tissue Res **350**(1): 127-134.
- Satheeshkumar, K. S., J. Murali and R. Jayakumar (2004). "Assemblages of prion fragments: novel model systems for understanding amyloid toxicity." J Struct Biol **148**(2): 176-193.
- Satoh, J., Y. Kuroda and S. Katamine (2000). "Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture." Am J Pathol **157**(1): 59-68.
- Scott, M., D. Foster, C. Mirenda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S. J. DeArmond, D. Westaway and S. B. Prusiner (1989). "Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques." Cell **59**(5): 847-857.
- Scott, M., D. Groth, D. Foster, M. Torchia, S. L. Yang, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1993). "Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes." Cell **73**(5): 979-988.
- Schatzl, H. M., L. Laszlo, D. M. Holtzman, J. Tatzelt, S. J. DeArmond, R. I. Weiner, W. C. Mobley and S. B. Prusiner (1997). "A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis." J Virol **71**(11): 8821-8831.
- Schmitt-Ulms, G., G. Legname, M. A. Baldwin, H. L. Ball, N. Bradon, P. J. Bosque, K. L. Crossin, G. M. Edelman, S. J. DeArmond, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (2001). "Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein." J Mol Biol **314**(5): 1209-1225.
- Schrock, Y., G. P. Solis and C. A. Stuermer (2009). "Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrPC)." FEBS Lett **583**(2): 389-393.
- Schwartz, M. and E. Schneider (2004). How the cows turned mad. Berkeley, University of California press.
- Shyng, S. L., J. E. Heuser and D. A. Harris (1994). "A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits." J Cell Biol **125**(6): 1239-1250.
- Shyng, S. L., M. T. Huber and D. A. Harris (1993). "A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells." J Biol Chem **268**(21): 15922-15928.
- Shyng, S. L., S. Lehmann, K. L. Moulder and D. A. Harris (1995). "Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells." J Biol Chem **270**(50): 30221-30229.
- Sigurdsson, E. M., D. R. Brown, M. A. Alim, H. Scholtzova, R. Carp, H. C. Meeker, F. Prelli, B. Frangione and T. Wisniewski (2003). "Copper chelation delays the onset of prion disease." J Biol Chem **278**(47): 46199-46202.
- Sikorska, B., R. Knight, J. W. Ironside and P. P. Liberski (2012). "Creutzfeldt-Jakob disease." Adv Exp Med Biol **724**: 76-90.
- Silva, J. L., M. P. Gomes, T. C. Vieira and Y. Cordeiro (2010). "PrP interactions with nucleic acids and glycosaminoglycans in function and disease." Front Biosci (Landmark Ed) **15**: 132-150.
- Silveira, J. R., G. J. Raymond, A. G. Hughson, R. E. Race, V. L. Sim, S. F. Hayes and B. Caughey (2005). "The most infectious prion protein particles." Nature **437**(7056): 257-261.
- Sim, V. L. and B. Caughey (2009). "Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils." Neurobiol Aging **30**(12): 2031-2042.
- Simon, D., M. E. Herva, M. J. Benitez, J. J. Garrido, A. I. Rojo, A. Cuadrado, J. M. Torres and F. Wandosell (2014). "Dysfunction of the PI3K-Akt-GSK-3 pathway is a common feature in cell culture and in vivo models of prion disease." Neuropathol Appl Neurobiol **40**(3): 311-326.

- Simons, M. and G. Raposo (2009). "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 575-581.
- Singh, N., D. Das, A. Singh and M. L. Mohan (2010). "Prion protein and metal interaction: physiological and pathological implications." Curr Issues Mol Biol **12**(2): 99-107.
- Solassol, J., C. Crozet and S. Lehmann (2003). "Prion propagation in cultured cells." Br Med Bull **66**: 87-97.
- Son, E. Y., J. K. Ichida, B. J. Wainger, J. S. Toma, V. F. Rafuse, C. J. Woolf and K. Eggan (2011). "Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons." Cell Stem Cell **9**(3): 205-218.
- Song, C. H., O. Honmou, H. Furuoka and M. Horiuchi (2011). "Identification of chemoattractive factors involved in the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to brain lesions caused by prions." J Virol **85**(21): 11069-11078.
- Sonntag, K. C., J. Pruszek, T. Yoshizaki, J. van Arensbergen, R. Sanchez-Pernaute and O. Isacson (2007). "Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin." Stem Cells **25**(2): 411-418.
- Spielhauer, C. and H. M. Schatzl (2001). "PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways." J Biol Chem **276**(48): 44604-44612.
- Stahl, N., M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame and S. B. Prusiner (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." Biochemistry **32**(8): 1991-2002.
- Stahl, N., D. R. Borchelt and S. B. Prusiner (1990). "Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C." Biochemistry **29**(22): 5405-5412.
- Steele, A. D., J. G. Emsley, P. H. Ozdinler, S. Lindquist and J. D. Macklis (2006). "Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3416-3421.
- Stewart, R. S. and D. A. Harris (2003). "Mutational analysis of topological determinants in prion protein (PrP) and measurement of transmembrane and cytosolic PrP during prion infection." J Biol Chem **278**(46): 45960-45968.
- Supattapone, S., H. O. Nguyen, F. E. Cohen, S. B. Prusiner and M. R. Scott (1999). "Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14529-14534.
- Tada, M., Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji and T. Tada (2001). "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells." Curr Biol **11**(19): 1553-1558.
- Tagliavini, F., P. M. Lievens, C. Tranchant, J. M. Warter, M. Mohr, G. Giaccone, F. Perini, G. Rossi, M. Salmona, P. Piccardo, B. Ghetti, R. C. Beavis, O. Bugiani, B. Frangione and F. Prelli (2001). "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 **276**(8): 6009-6015.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.
- Takakura, Y., N. Yamaguchi, T. Nakagaki, K. Satoh, J. Kira and N. Nishida (2008). "Bone marrow stroma cells are susceptible to prion infection." Biochem Biophys Res Commun **377**(3): 957-961.
- Tanabe, K., D. Haag and M. Wernig (2015). "Direct somatic lineage conversion." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **370**(1680): 20140368.
- Taraboulos, A., A. J. Raeber, D. R. Borchelt, D. Serban and S. B. Prusiner (1992). "Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells." Mol Biol Cell **3**(8): 851-863.
- Taraboulos, A., D. Serban and S. B. Prusiner (1990). "Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells." J Cell Biol **110**(6): 2117-2132.

- Tark, D., H. Kim, M. H. Neale, M. Kim, H. Sohn, Y. Lee, I. Cho, Y. Joo and O. Windl (2015). "Generation of a persistently infected MDBK cell line with natural bovine spongiform encephalopathy (BSE)." PLoS One **10**(2): e0115939.
- Taylor, D. R. and N. M. Hooper (2006). "The prion protein and lipid rafts." Mol Membr Biol **23**(1): 89-99.
- Taylor, D. R. and N. M. Hooper (2007). "The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein." Biochem J **402**(1): 17-23.
- Telling, G. C., P. Parchi, S. J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, J. Mastrianni, E. Lugaresi, P. Gambetti and S. B. Prusiner (1996). "Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity." Science **274**(5295): 2079-2082.
- Thier, M., P. Worsdorfer, Y. B. Lakes, R. Gorris, S. Herms, T. Opitz, D. Seiferling, T. Quandel, P. Hoffmann, M. M. Nothen, O. Brustle and F. Edenhofer (2012). "Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells." Cell Stem Cell **10**(4): 473-479.
- Tobler, I., T. Deboer and M. Fischer (1997). "Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice." J Neurosci **17**(5): 1869-1879.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride and J. C. Manson (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380**(6575): 639-642.
- Torper, O., U. Pfisterer, D. A. Wolf, M. Pereira, S. Lau, J. Jakobsson, A. Bjorklund, S. Grealish and M. Parmar (2013). "Generation of induced neurons via direct conversion in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(17): 7038-7043.
- Tremblay, P., E. Bouzamondo-Bernstein, C. Heinrich, S. B. Prusiner and S. J. DeArmond (2007). "Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo." Brain Res **1139**: 60-67.
- Uchida, N., D. W. Buck, D. He, M. J. Reitsma, M. Masek, T. V. Phan, A. S. Tsukamoto, F. H. Gage and I. L. Weissman (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14720-14725.
- Urbach, A., O. Bar-Nur, G. Q. Daley and N. Benvenisty (2010). "Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells." Cell Stem Cell **6**(5): 407-411.
- Vanderhaeghen, P. (2012). "Generation of cortical neurons from pluripotent stem cells." Prog Brain Res **201**: 183-195.
- Vassallo, N. and J. Herms (2003). "Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse." J Neurochem **86**(3): 538-544.
- Vella, L. J., R. A. Sharples, V. A. Lawson, C. L. Masters, R. Cappai and A. F. Hill (2007). "Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing." J Pathol **211**(5): 582-590.
- Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S. J. DeArmond, E. J. Smart, R. G. Anderson, A. Taraboulos and S. B. Prusiner (1996). "Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14945-14949.
- Vierbuchen, T., A. Ostermeier, Z. P. Pang, Y. Kokubu, T. C. Sudhof and M. Wernig (2010). "Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors." Nature **463**(7284): 1035-1041.
- Vilches, S., C. Vergara, O. Nicolas, G. Sanclimens, S. Merino, S. Varon, G. A. Acosta, F. Albericio, M. Royo, J. A. Del Rio and R. Gavin (2013). "Neurotoxicity of prion peptides mimicking the central domain of the cellular prion protein." PLoS One **8**(8): e70881.
- Vilette, D., O. Andreoletti, F. Archer, M. F. Madelaine, J. L. Vilotte, S. Lehmann and H. Laude (2001). "Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4055-4059.
- Vincent, I., G. Jicha, M. Rosado and D. W. Dickson (1997). "Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain." J Neurosci **17**(10): 3588-3598.

- Wadia, J. S., M. Schaller, R. A. Williamson and S. F. Dowdy (2008). "Pathologic prion protein infects cells by lipid-raft dependent macropinocytosis." *PLoS One* **3**(10): e3314.
- Walz, R., O. B. Amaral, I. C. Rockenbach, R. Roesler, I. Izquierdo, E. A. Cavalheiro, V. R. Martins and R. R. Brentani (1999). "Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein." *Epilepsia* **40**(12): 1679-1682.
- Wang, F., X. Wang, C. G. Yuan and J. Ma (2010). "Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein." *Science* **327**(5969): 1132-1135.
- Wang, F., F. Yang, Y. Hu, X. Wang, X. Wang, C. Jin and J. Ma (2007). "Lipid interaction converts prion protein to a PrP^{Sc}-like proteinase K-resistant conformation under physiological conditions." *Biochemistry* **46**(23): 7045-7053.
- Wang, Y., J. Cui, X. Sun and Y. Zhang (2011). "Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation." *Cell Death Differ* **18**(4): 732-742.
- Watanabe, T., Y. Yasutaka, T. Nishioku, A. Nakashima, K. Futagami, A. Yamauchi and Y. Kataoka (2012). "Atorvastatin stimulates neuroblastoma cells to induce neurite outgrowth by increasing cellular prion protein expression." *Neurosci Lett* **531**(2): 114-119.
- Weissmann, C. and A. Aguzzi (1999). "Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble." *Science* **286**(5441): 914-915.
- Weissmann, C., H. Bueler, M. Fischer, A. Sailer, A. Aguzzi and M. Aguet (1994). "PrP-deficient mice are resistant to scrapie." *Ann N Y Acad Sci* **724**: 235-240.
- Wells, G. A., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson and R. Bradley (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." *Vet Rec* **121**(18): 419-420.
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B. E. Bernstein and R. Jaenisch (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." *Nature* **448**(7151): 318-324.
- Wilesmith, J. W., G. A. Wells, M. P. Cranwell and J. B. Ryan (1988). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies." *Vet Rec* **123**(25): 638-644.
- Will, R. G. (2003). "Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru." *Br Med Bull* **66**: 255-265.
- Williams, E. S. and S. Young (1980). "Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy." *J Wildl Dis* **16**(1): 89-98.
- Wolf, H., A. Hossinger, A. Fehlinger, S. Buttner, V. Sim, D. McKenzie and I. M. Vorberg (2015). "Deposition pattern and subcellular distribution of disease-associated prion protein in cerebellar organotypic slice cultures infected with scrapie." *Front Neurosci* **9**: 410.
- Wong, K., Y. Qiu, W. Hyun, R. Nixon, J. VanCleave, J. Sanchez-Salazar, S. B. Prusiner and S. J. DeArmond (1996). "Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP₃ release." *Neurology* **47**(3): 741-750.
- Wyatt, J. M., G. R. Pearson, T. N. Smerdon, T. J. Gruffydd-Jones, G. A. Wells and J. W. Wilesmith (1991). "Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats." *Vet Rec* **129**(11): 233-236.
- Xie, W. L., Q. Shi, J. Zhang, B. Y. Zhang, H. S. Gong, Y. Guo, S. B. Wang, Y. Xu, K. Wang, C. Chen, Y. Liu and X. P. Dong (2015). "Abnormal activation of microglia accompanied with disrupted CX3CR1/CX3CL1 pathway in the brains of the hamsters infected with scrapie agent 263K." *J Mol Neurosci* **51**(3): 919-932.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, I. and J. A. Thomson (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." *Science* **318**(5858): 1917-1920.

- Zhao, P., Z. Luo, W. Tian, J. Yang, D. P. Ibanez, Z. Huang, M. D. Tortorella, M. A. Esteban and W. Fan (2014). "Solving the puzzle of Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **239**(11): 1421-1432.
- Zhu, S., G. S. Victoria, L. Marzo, R. Ghosh and C. Zurzolo (2015). "Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles." Prion **9**(2): 125-135.
- Zou, S., C. T. Fang and L. B. Schonberger (2008). "Transfusion transmission of human prion diseases." Transfus Med Rev **22**(1): 58-69.
- Zou, W. Q., G. Puoti, X. Xiao, J. Yuan, L. Qing, I. Cali, M. Shimoji, J. P. Langeveld, R. Castellani, S. Notari, B. Crain, R. E. Schmidt, M. Geschwind, S. J. Dearmond, N. J. Cairns, D. Dickson, L. Honig, J. M. Torres, J. Mastrianni, S. Capellari, G. Giaccone, E. D. Belay, L. B. Schonberger, M. Cohen, G. Perry, Q. Kong, P. Parchi, F. Tagliavini and P. Gambetti (2010). "Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein." Ann Neurol **68**(2): 162-172.

ANEXOS

Tabla III. Medios de cultivo celular

Medio de cultivo para fibroblastos de prepucio humano (HFF1, SCRC-1041, ATCC)
<ul style="list-style-type: none">• Medio DMEM (alto en glucosa, D6546-500ml; Sigma-Aldrich)• 10% SFB (TM-500ml; Invitrogen)• Insulina-transferrina-selenio (ITS-A 1X) (41400045- 5 ml; Invitrogen)• 2 mM L-glutamina (G7513-100ml; Sigma-Aldrich)• 1% penicilina/estreptomicina (D6546-100ml; Sigma-Aldrich)

Tabla II Medio de cultivo para fibroblastos de prepucio humano (HFF1), fibroblastos portadores de la mutación Y218N y fibroblastos de donante sano.

Medio embionario <i>hESC</i> ,para el mantenimiento de células humanas pluripotentes inducidas (<i>hiPSC</i>)
<ul style="list-style-type: none">• Medio Knockout-DMEM (Gibco, Invitrogen)• 20% de suero Knockout (KSR, 10828028-500mL; Invitrogen)• 1 mM NEAA 1X (12383, 10 Nm -100 ml; Gibco)• 0.1 mM β-mercaptoetanol (31350-20ml; Gibco)• 0,5% penicilina/estreptomicina (P0781-100ml; Sigma)• 2 mM L-glutamax a (35050038-100mL; Invitrogen)• 1 mM piruvato de sodio (11360-39, 100Mm, 100x-100ml; Gibco)• 10 ng / ml bFGF a 10 ng / ml (13256, Invitrogen).

Tabla III Medio de cultivo para *hESC/ hiPSC*. Nota: para la obtención de medio acondicionado *hESC* utilizado en *hiPSC* en condiciones libres de *feeders*, el medio hES es incubado (acondicionado) durante 24 horas sobre una capa de *feeders* HFF1-IRR.

Medio de inducción neuronal DDM
<ul style="list-style-type: none">• Medio DMEM / F-12 alto en glucosa, (31330095-500ml; Invitrogen)• Suplemento N2 1X (17502-048-100x; Gibco)• Suplemento B27 sin vitamina A 1X (12587-010-50X, 10ml;Gibco)• 1mM aminoácidos no esenciales (NEAA) 11140-035 100X- 100ml; Gibco),• 0.1 mM β-mercaptoetanol (21985-25 ml; Gibco)• 1mM piruvato de Sodio (11360-070-100 ml; Gibco)• 2 mM glutamax (35050038-100mL; Invitrogen)• 10 mM SB431542 (1614-1mg; Tocris, 4 días)• 100 nM LDN-193189 (130-096-226-2mg; Miltenyi Biotech, 10 días)

Tabla IV Medio de inducción neuronal

Medio de diferenciación neuronal (Medio N2B27)
<ul style="list-style-type: none">• Medio neurobasal (21103-049-500mL; Gibco)• 1X suplemento B27 sin vitamina A (12587-010 50X-10ml; Gibco)• 2 mM glutamax (35050038-100mL; Invitrogen)

Tabla V Medio de diferenciación neuronal (Medio N2B27).

Tabla VI. Líneas de fibroblastos

Descripción	Especie	Tipo celular	Sexo	Estatus	Enfermedad	Sitio de Biopsia
Fibroblastos humanos. Línea comercial	Humana	Fibroblastos en monocapa	masculino	Utilizados como <i>feeders</i> para hiPSC.	Persona sana	Fibroblastos de la piel de prepucio

Tabla VII Fibroblastos utilizados como control a la expresión de PrP^C y de la diferenciación neuronal, así como células alimentadoras y de soporte.

Tabla VIII. Inóculos infecciosos

Inóculos	Referencia
ECJe	Leiderman, Decker et al. 1986
ECJg-E200K	Jarius, Kovacs et al. 2003
IFe	Manetto, Medori et al. 1992
GSS-Y218N	Alzualde, Indakoetxea et al. 2010
Scrapie-263K	Liberski 1986

Tabla IX Inóculos obtenidos a partir de homogeneizados de tejido encefálico post-mortem al 10% (p/v) de pacientes que habían desarrollado alguna EET.

Tabla X. Tampón de RIPA

Tampón de RIPA
<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Tris HCl pH7.5 • 150 mM NaCl • 1% NP-40 • 0.25% desoxicolato de sodio • 0.1% SDS, 1 mM EDTA • Cóctel inhibidor de proteasas

Tabla XI Tampón de RIPA. Tris HCl (hidrocloruro de Tris); NaCl (Cloruro de sodio); NO-40: Nonidet P-40 (octil phenoxy polyethoxy ethanol); EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Tabla XII Proteínas analizadas mediante WB e IF.

Proteínas neuronales y de desarrollo		kDa
PrP ^C	Proteína prion celular	33-35
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	37
TuJ 1	Beta III tubulina	43
NEUN	Núcleos neuronales	46
NES	Nestina	50

Tabla XIII Proteínas no neuronales (estructurales, gliales) y neuronales (maduración temprana, intermedia y tardía) para el análisis mediante la técnica de WB.

Proteínas neuronales y de desarrollo	
PrP ^C	Proteína prión celular
Tau	Proteína Tau
TuJ1	Beta III tubulina
DCX	Doblecortina
NEUN	Núcleos neuronales
SV2	Vesículas sinápticas
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos
vGLUT	Transportador de glutamato asociado a vesículas
A β	Beta-amiloide
CB	Calbindina
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
NES	Nestina
UB3A	Ubiquitin-ligasa

Tabla XIV Proteínas no neuronales (estructurales, gliales) y neuronales (maduración temprana, intermedia y tardía) para el análisis mediante la técnica de IF.**Tabla XV** Anticuerpos para el análisis de proteínas mediante IF y WB.

- Tabla de anticuerpos primarios**

Anticuerpo primario	Especie hospedadora	Dilución	Referencia
3F4 -PrP ^C	Ratón	1/5000	406068
GAPDH (V-18)	Cabra	1/1000	sc-20357
TuJ1	Conejo	1/1000	ab6046, Abcam
NeuN	Clon A60 IgG	1/200	Abcam, Cambridge, UK
Nes	ratón	1/200	MAP 353 Millipore

Tabla XVI Anticuerpos primarios utilizados en WB.

Símbolo	siglas en castellano	Epítipo	Especie hospedadora	Dilución	Referencia
Anti-PrP ^C	Anti-proteína prion celular	Proteína PrP humana y hámster	Ratón	1/500	406068
Anti-TAU	Anti-Tau	Proteína asociada a microtubulos deTau humana	Ratón	1/1000	MN1020
Anti-Tuj1	Anti-beta III tubulina	Neuronas específicas de β -tubulina de clase III en células progenitoras neurales humanas	Conejo	1/750	AB6046
Anti-DCX	Anti-doblecortina	Proteína asociada a la diferenciación neuronal/Extremo C-terminal de la proteína Doublecortina	Cabra	1/500	SC-8066
Anti-MAP2	Anti-proteína asociada a microtúbulos	Proteína asociada a microtubulos	Conejo	1/500	AB5622
Anti- A β	Anti-beta-amiloide	Depósitos Beta Amiloide/ componente principal de las placas neuríticas en la enfermedad de Alzheimer	Ratón	1/500	803001
Anti-CB	Anti-calbindina	Proteína de unión a calcio dependiente de la vitamina D específica a oligodendrocitos	Ratón	1/1000	MO19000
Anti-GFAP	Anti-proteína ácida fibrilar glial	proteína de filamentos intermedios de tipo III específica de la glía	Conejo	1/500	Z0334
Anti-NES	Anti-nestina	Filamentos intermedios clase VI en progenitors neuronalas	Ratón	1/200	MO15012
Anti- UB3A	Anti-ubiquitin-ligasa	Residuos en UBE3A Humano de la ubiquitin ligasa	Conejo	1/100	AB183869
Anti-vGlut	Anti-transportador de glutamato asociado a vesículas	Transportador de glutamato en la membrana de las vesículas sinápticas/ terminales nerviosas glutamatérgicas	Conejillo de indias	1/500	AB5905
Anti-NeuN	Anti-núcleos neuronales	Proteína de unión a ADN	Ratón	1/200	LV1825845
Anti-SV2	Anti-vesículas sinápticas	Vesículas sinápticas neuronales	Ratón	1/500	Hybridoma Bank

Tabla XVII Anticuerpos primarios utilizados en IF y microscopia.

- **Tabla de anticuerpos secundarios**

Anticuerpo secundario/ Especie hospedadora	Dilución	Referencia
IgG de burro anti-cabra-HRP	1/5000	Sc-2020
IgG de cabra anti ratón-HRP	1/3000	sc-2005
IgG de cabra anti conejo-HRP	1/10.000	sc-2030

Tabla XVIII Anticuerpos secundarios utilizados en WB.

Anticuerpo secundario/ Especie hospedadora	Dilución	Referencia
IgG de burro anti ratón- Alexa Fluor 488	1/500	811493
IgG de burro anti cabra- Alexa Fluor 488	1/500	682638
IgG de burro anti conejo- Alexa Fluor 488	1/500	819556
IgG de burro anti ratón- Alexa Fluor 647	1/500	1613070
IgG de burro anti cabra- Alexa Fluor 647	1/500	737682
IgG de burro anti conejo- Alexa Fluor 647	1/500	1069817
IgG de burro anti ratón- Alexa Fluor 546	1/500	1622582
IgG de burro anti cabra- Alexa Fluor 546	1/500	106943
IgG de burro anti conejo- Alexa Fluor 546	1/500	625746
IgG de cabra anti conejillo de indias- Alexa Fluor 488	1/500	1458638

Tabla XIX Anticuerpos secundarios utilizados en IF.

Tabla XX. Genes marcadores de pluripotencia, regionales y de desarrollo neuronal analizados mediante qPCR.

Secuencia de los cebadores marcadores de pluripotencia			
Símbolo	Ida	Vuelta	Tamaño (pb)
Oct3/4	ATGCACAACGAGAGGATTTGA	CTTTGTGTTCCCAATTCTTCC	337
Sox2	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	TTGCGTGAGTGTGGATGGGGATTGGTG	151
Nanog	TGAACCTCAGCTACAAACAG	TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG	154
Rex1	TGGAGGAATACCTGGCATTGACC	AGCGATTGCGCTCAGACTGTCATA	106

Tabla XXI Secuencias de las sondas (oligos) específicos utilizados para marcadores de pluripotencia.

Símbolo	Siglas en castellano	Ida	Vuelta	Tamaño (pb)
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído 3-fosfoato deshidrogenasa	TGCACCACCACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87
<i>PAX6</i>	Proteína pareada a caja 6	CCGGCAGAAGATTGTAGAGC	CGTTGGACACGTTTTGATTG	119
<i>FOXG1</i>	Horquilla de caja G1	AGAAGAACGGCAAGTACGAGA	TGTTGAGGGACAGATTGTGGC	189
<i>CALB1</i>	Calbindina	GACGGAAGTGGTTACCTGGA	TGCCATACTGATCCACAAA	125
<i>NES</i>	Nestina	ACAGCCATAGAGGGCAAAGTGGA	AAGGAACCTGGGAGTCTGGATTT	97
<i>TUJ1</i>	Beta III tubulina	AGTCGCCACGTAGTTGC	CGCCCAGTATGAGGGAGAT	126
<i>DCX</i>	Proteína doblecortina	CATCCCCAACCTCAGAAG	GGAGGTTCCGTTTGCTGA	89
<i>MAP2</i>	Proteína asociada a microtúbulos	CCGTGTGGACCATGGGGCTG	GTCGTGGGGTGATGCCACG	71
<i>MAPT</i>	Proteína Tau asociada a microtúbulos	GATTGGGTCCCTGGACAATA	GTGGTCTGTCTTGGCTTTGG	106
<i>EMX1</i>	Secuencia Homebox 1 de espiráculos vacíos	CCTTCGAGAAGAACCCTACG	TGCCGTTTGTACTTTGCTCT	120
<i>SOX1</i>	Cuadro 1 región determinante del sexo Y	ATTATTTTGCCGTTTTCCC	TCAAGGAAACACAATCGCTG	108
<i>GFAP</i>	Proteína ácida fibrilar glial	TCTCTCGGAGTATCTGGAACTG	TTCCCTTCTGTCTGAGTCTCA	81
<i>SOX2</i>	Cuadro 2 región determinante del sexo Y	CACGTGGTGGTGCAGAAA	AGTGTATGAGGCCGACAGT	151
<i>VGLUT</i>	Transportador de glutamato asociado a vesículas	CACGTGGTGGTGCAGAAA	CGTGTATGAGGCCGACAGT	61

Tabla XXII Secuencias de las sondas (oligos) específicos utilizados para caracterizar el perfil transcripcional de genes regionales y de desarrollo en neuronas.