



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

**CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS
OBTENIDOS DE LÍQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO DE OVINO CON
SCRAPIE Y DESARROLLO DE MODELOS
CELULARES DE LA ENFERMEDAD**

Autora

Sara Gómez Redrado

Directores

Inmaculada Martín Burriel

Janne Toivonen

Facultad de Ciencias

Curso académico 2017/2018

ABREVIATURAS

CIEETE	Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes
Ct	Ciclo umbral (<i>cycle threshold</i>)
DLS	Dispersión dinámica de luz (<i>dynamic light scattering</i>)
EET	Encefalopatía espongiiforme transmisible
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
ILV	Vesículas intraluminales (<i>intraluminal vesicles</i>)
INA	Instituto de Nanociencia de Aragón
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MSCs	Células madre mesenquimales (<i>mesenchymal stem cells</i>)
LAGENBIO	Laboratorio de Genética Bioquímica
MVB	Cuerpo multivesicular (<i>multivesicular body</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMCA	Amplificación cíclica de proteínas malplegadas (<i>protein-misfolding cyclic amplification</i>)
PrP	Proteína prión
PrP^C	Proteína prión celular
PrP^{Sc}	Proteína prión patológica
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SNC	Sistema nervioso central
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>transmission electron microscopy</i>)

ÍNDICE

RESUMEN	3
PALABRAS CLAVE	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES	5
1.1.1 <i>Scrapie</i>	7
1.1.1.1 Cuadro clínico	7
1.1.1.2 Polimorfismos del gen PRNP y su papel en la enfermedad	7
1.1.1.3 Potencial zoonótico	8
1.1.1.4 Diagnóstico	8
1.2 EXOSOMAS	9
1.2.1 <i>Biogénesis exosomal</i>	9
1.2.2 <i>Carga, función y aplicaciones de los exosomas</i>	10
1.2.3 <i>Exosomas y enfermedades priónicas</i>	11
1.2.3.1 Propagación de priones en exosomas	12
1.2.3.2 Potencial de los exosomas para el diagnóstico de las enfermedades priónicas	13
1.3 MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LAS EETS	15
1.3.1 <i>Células madre mesenquimales</i>	16
1.3.2 <i>Células madre mesenquimales y enfermedades priónicas</i>	17
1.3.2.1 Potencial de las MSCs como modelo para el estudio de las EETS	17
1.3.2.2 Potencial de las MSCs como terapia celular frente a las EETS	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 MUESTRAS	20
3.2 AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE EXOSOMAS	20
3.3 CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS	21
3.3.1 <i>Análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión (TEM, transmission electron microscopy)</i>	21
3.3.2 <i>Dispersión dinámica de luz (DLS, dynamic light scattering)</i>	21
3.3.3 <i>Western-Blot</i>	21
3.4 EVALUACIÓN DEL PERFIL DE MIRNAS	22
3.4.1 <i>Extracción de RNA</i>	22
3.4.2 <i>Retrotranscripción a cDNA</i>	23
3.4.3 <i>RT-qPCR</i>	23
3.4.4 <i>Análisis de expresión y estadístico</i>	23
3.5 MANTENIMIENTO Y EXPANSIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES	24

3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA -----	24
3.7 ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR-----	25
3.8 INFECCIÓN DE MSCs CON INÓCULO CEREBRAL DE OVINO CON SCRAPIE-----	26
3.8.1 Determinación de PrP ^{Sc} -----	26
3.8.2 Análisis de genes post-infección -----	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	28
4.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS-----	28
4.1.1 Detección de marcadores proteicos-----	28
4.1.2 Análisis morfológico-----	29
4.1.3 Distribución de tamaño de partícula-----	30
4.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MIERNAS EN MUESTRAS DE OVINO CONTROL Y CON SCRAPIE---	31
4.3 EVALUACIÓN DE MSCs OVINAS COMO MODELO <i>IN VITRO</i> DE EETS-----	34
4.3.1 Caracterización de las MSCs -----	35
4.3.1.1 Diferenciación neurogénica -----	35
4.3.1.2 Expresión de genes asociados a la replicación priónica -----	36
4.3.1.3 Proliferación celular -----	38
4.3.2 Inoculación de MSCs con extractos de cerebro ovino -----	39
4.3.2.1 Replicación de los priones por las MSCs-----	39
4.3.2.2 Expresión de genes asociados a la replicación priónica tras la infección-----	40
4.3.2.3 Efecto del tejido cerebral sobre la proliferación celular de las MSCs -----	42
5. CONCLUSIONES -----	44
6. BIBLIOGRAFÍA -----	46
ANEXOS-----	51
ANEXO I. WESTERN BLOT-----	51
ANEXO 2. RT-QPCR -----	52

RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas letales que afectan a animales y humanos y se caracterizan por la acumulación de una isoforma patológica (PrP^{Sc}) de la proteína príon celular (PrP^C) en las células nerviosas. Con el fin de identificar potenciales biomarcadores para el diagnóstico de las EETs, se analizó la expresión de una batería de miRNAs que se han visto alterados en distintas enfermedades neurodegenerativas en líquido cefalorraquídeo (LCR) de ovino con scrapie, el prototipo animal de las EETs. Se observaron diferencias significativas entre animales enfermos y sanos para los niveles de miR-486-5p, miR-146a-5p y miR-21-5p. Dado que los exosomas transportan entre células factores que favorecen el desarrollo de la patología, se realizaron los mismos análisis en la fracción exosomal del LCR, sin embargo, el aislamiento de exosomas no facilitó la detección de miRNAs desregulados dada su baja concentración.

Por otro lado, se planteó implementar un modelo celular para el estudio de las EETs. Con este objetivo, se cultivaron, tanto en condiciones de crecimiento estándar como de diferenciación neurogénica, células madre mesenquimales (MSCs) procedentes de la médula ósea de 3 ovejas con genotipos relacionados con una alta susceptibilidad al scrapie (ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ). Las MSCs sometidas a diferenciación neurogénica sufrieron ligeros cambios morfológicos y el descenso de la expresión del gen que codifica el factor de transcripción *OCT4*, asociado a la pluripotencia de las células madre. Además se vio alterada la expresión de genes asociados a la replicación priónica. Después se inocularon los cultivos con extracto cerebral de ovino con scrapie y se analizó la cantidad de proteína patológica en los mismos a distintos tiempos. Los cultivos mostraron distinta capacidad de replicación del príon y la inoculación produjo alteraciones en la proliferación y la expresión génica de las MSCs. Aunque hay que seguir investigando para confirmar el efecto del genotipo en la respuesta a la infección, los resultados obtenidos confirman el potencial de las MSCs como modelo para el estudio de las EETs.

PALABRAS CLAVE

Encefalopatías espongiformes transmisibles, scrapie, líquido cefalorraquídeo, exosomas, miRNAs, modelos celulares, células mesenquimales.

ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a group of lethal neurodegenerative diseases that affect animals and humans and are characterized by the accumulation of a pathological isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^C) in nerve cells. In order to identify potential biomarkers for the diagnosis of TSEs, the expression of a set of miRNAs that have been altered in different neurodegenerative diseases in cerebrospinal fluid (CSF) of sheep with scrapie, the animal prototype of TSEs, was analysed. Significant differences between sick and healthy animals were observed for the levels of miR-486-5p, miR-146a-5p and miR-21-5p. Since exosomes transport factors that favor the development of the pathology between cells, the same analysis was performed on the exosomal fraction of the CSF. However, the isolation of exosomes did not facilitate the detection of deregulated miRNAs given their low concentration.

On the other hand, the implementation of a cellular model for the study of TSEs was proposed. To this end, bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) of 3 sheep with genotypes related to high susceptibility to scrapie (ARQ/ARQ, VRQ/VRQ and ARQ/VRQ) were cultured under both standard growth conditions and neurogenic differentiation. The MSCs subjected to neurogenic differentiation underwent slight morphological changes and the decrease in the expression of the gene that encodes the transcription factor *OCT4*, linked to stem cell pluripotency. Furthermore, the expression of genes related to prion replication was altered. The MSCs were then inoculated with brain extract of sheep with scrapie and the amount of the pathological protein was measured at different times. The cultures showed different capacity of prion replication and the inoculation produced alterations in the proliferation and gene expression of the MSCs. Although further research is needed to confirm the effect of the genotype on the response to infection, the results confirm the potential of MSCs as a model for the study of TSEs.

KEYWORDS

Transmissible spongiform encephalopathies, scrapie, cerebrospinal fluid, exosomes, miRNAs, cellular models, mesenchymal stem cells.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles

También denominadas enfermedades priónicas, las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas letales que afectan a animales y humanos. Inducen una degeneración progresiva de tipo espongiforme del sistema nervioso central (SNC) asociada a la acumulación de una isoforma patológica de la proteína prión (PrP) en las células nerviosas. Se manifiestan por un conjunto de síntomas nerviosos como pérdida del control motor, demencia o parálisis. Éstos aparecen tras un largo periodo de incubación (Takemura et al. 2004)(Badiola and Pumarola 2010).

Existen dos isoformas de la PrP: la proteína prión celular normal (PrP^C) y la proteína prión patológica (PrP^{Sc}) o prión. Ambas están codificadas por el gen de copia única *PRNP* y tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero difieren en la estructura secundaria y terciaria; en PrP^C predomina la estructura alfa helicoidal y en PrP^{Sc} las láminas beta (Figura 1). Las diferencias conformacionales comentadas confieren a la PrP^{Sc} resistencia a la proteólisis y a la degradación por medios convencionales de desinfección química y física, mientras que la PrP^C es soluble en detergentes no desnaturizantes y susceptible a la degradación por proteasas (Imran and Saqib 2011).

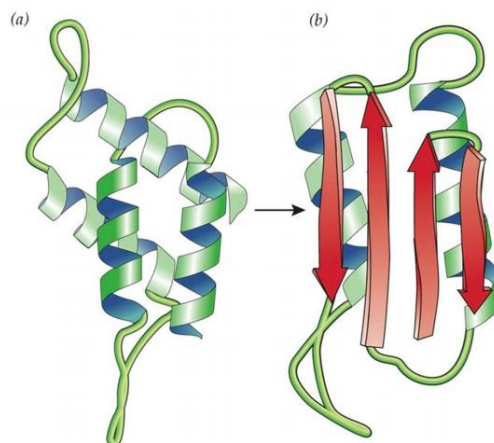


Figura 1. Representación de la estructura de PrP^C (a) y PrP^{Sc} (b). Imagen tomada de *Science Break: Prions* (Kuhn 2015).

Otra peculiaridad de los priones es que son capaces de autopropagarse, de modo que cuando una PrP^{Sc} es adquirida por infección o surge debido a una mutación en el gen *PRNP* del huésped o a la conversión espontánea de una PrP^C, ésta es capaz de reclutar las moléculas de PrP^C nativas e inducir un cambio conformacional provocando su conversión a la isoforma patológica. A medida que los niveles de PrP^{Sc} aumentan, este proceso se vuelve más eficiente,

lo que lleva a una acumulación de la isoforma patológica en las células neuronales en forma de agregados proteicos insolubles que causan disfunción y muerte celular (Aguzzi and Heppner 2000; Atkinson et al. 2016; Geschwind 2015).

A pesar de su papel en la inducción de la enfermedad priónica, la PrP^C está muy conservada en mamíferos, probablemente debido a que tiene funciones beneficiosas como la neuroprotección que evitan su eliminación evolutiva. Por lo tanto, la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} conlleva, además de la formación de agregados proteicos patológicos, la pérdida de las funciones fisiológicas de la PrP^C, efecto que también contribuye a la patogénesis de las enfermedades priónicas (Westergard, Christensen, and Harris 2007).

En diversos estudios se ha observado, utilizando ratones transgénicos con distinto número de copias del gen *PRNP*, que el nivel de expresión de la PrP^C influye en los tiempos de incubación y el progreso de la enfermedad priónica. Cuanto menor es el nivel de expresión menor es la susceptibilidad a la enfermedad, siendo los ratones Knockout para este gen completamente resistentes (Büeler et al. 1994). Estos trabajos confirman que la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} es el principal evento patológico de la enfermedad priónica, pero además de la PrP^C puede haber otros factores que favorezcan esta transformación. En esta línea de investigación cabe destacar un estudio en el que, al observar que preparaciones de RNA procedentes de mamíferos estimulaban la amplificación de la PrP^{Sc} *in vitro* pero no ocurría lo mismo con preparaciones de RNA procedentes de invertebrados, se concluyó que moléculas específicas de RNA codificadas en el huésped estimulan la conversión de la PrP^C desempeñando así un papel en la patogénesis priónica (Deleault, Lucassen, and Supattapone 2003).

Las EET humanas se clasifican en función de su etiología en tres grupos: esporádicas (85-90%), genéticas (10-15%) y adquiridas (1-3%). La forma esporádica aparece de forma espontánea y se denomina Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) esporádica. Las genéticas están causadas por mutaciones autosómicas dominantes en el gen *PRNP* y se subdividen en ECJ genética, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker e insomnio fatal familiar. Las adquiridas incluyen la ECJ iatrogénica, el Kuru y la variante de la ECJ, y se adquieren por exposición a priones humanos a través de procedimientos médicos o quirúrgicos, endocanibalismo y consumo de alimentos contaminados, respectivamente (Prusiner 1995; Takada and Geschwind 2013). En cuanto a las EET animales cabe destacar la encefalopatía espongiiforme bovina, conocida coloquialmente como "enfermedad de las vacas locas", al ser la de mayor transcendencia por la epidemia causada en Reino Unido a mediados de los 80 y su

capacidad para transmitirse a la especie humana, y el Scrapie, la EET prototipo y en la que nos vamos a centrar en este trabajo.

1.1.1 Scrapie

Es una EET que afecta a la especie ovina y caprina. La primera referencia de su existencia apareció en Gran Bretaña en 1732 y durante los siglos XVIII y XIX fueron describiéndose casos en Europa continental en diferentes razas de ovejas. Posteriormente se han ido registrado casos en todo el mundo, afectando la enfermedad a la mayoría de las regiones con producción ovina excepto Australia y Nueva Zelanda (Detwiler 1992; Detwiler and Baylis 2003).

1.1.1.1 Cuadro clínico

Podemos distinguir dos tipos de scrapie, el clásico, conocido desde hace siglos, y el atípico, una presentación de la enfermedad que difiere de la primera en distintos aspectos y cuyos primeros casos fueron descritos en Noruega en 1998. Estos tipos están causados por distintas cepas de priones. Una de las principales diferencias es la edad en la que los animales presentan la enfermedad; mientras que el scrapie clásico aparece entre los 2 y 5 años, los afectados por scrapie atípico suelen tener 6 o más años. En cuanto a los parámetros clínicos, suelen darse cambios tanto en el estado mental y el comportamiento como posturales y de locomoción, pero no todos los síntomas están presentes en todos los casos e incluso se han confirmado casos sin sintomatología. El primer signo del scrapie clásico suele ser una tendencia del animal a separarse del rebaño y presentar resistencia a ser manipulado, otros signos muy típicos son prurito, que se refleja en un incremento de la conducta de acicalamiento y que provoca la pérdida de la lana y lesiones en la piel, ataxia (pérdida de coordinación) y temblores, razón por la que esta enfermedad también recibe el nombre de tembladera. En la fase terminal de la enfermedad el animal permanece recostado y la muerte suele darse tras 4-6 meses. El scrapie atípico se caracteriza por la presencia de ataxia, sin prurito ni alteraciones de la lana. En cualquier caso, los síntomas clínicos, dependen en gran medida de la cepa priónica y del genotipo del animal para el gen *PRNP* (Badiola and Pumarola 2010; Curcio et al. 2016).

1.1.1.2 Polimorfismos del gen PRNP y su papel en la enfermedad

El gen *PRNP* ovino presenta múltiples polimorfismos, entre los que cabe destacar por su elevada frecuencia y su influencia en el grado de susceptibilidad o resistencia de las ovejas al scrapie, los presentes en los siguientes tres codones: 136 (Alanina(A)/Valina(V)), 154 (Arginina(R)/Histidina(H)) y 171 (Glutamina(Q)/Arginina(R) o Glutamina(Q)/Histidina(H)). Estos alelos se combinan dando lugar a 5 haplotipos principales: ARQ, ARR, ARH, AHQ y VRQ (Badiola and Pumarola 2010). Se han publicado numerosos trabajos en los que se ha estudiado la

distribución de estos alelos en distintas razas así como su influencia en la susceptibilidad a la enfermedad, a partir de los cuales se ha concluido lo siguiente:

- Los alelos ARR y AHQ se asocian con resistencia al scrapie.
- El alelo VRQ es el más relacionado con la susceptibilidad, siendo los animales homocigotos para este alelo los que presentan mayor riesgo. Los heterocigotos con uno de los alelos resistentes (ARR o AHQ) son susceptibles pero tienen menor riesgo.
- La forma ancestral del gen corresponde a la variante ARQ, que también se asocia con la susceptibilidad, pero en menor medida. El haplotipo ARH muestra una susceptibilidad similar al ARQ.

La susceptibilidad al scrapie atípico es diferente, de hecho parece estar asociado a animales con genotipos resistentes al scrapie clásico (Moum et al. 2005). Los polimorfismos en el gen *PRNP* y la cepa priónica también se han visto relacionados con otros aspectos de la enfermedad (Badiola and Pumarola 2010), como los signos clínicos, como se ha comentado previamente, la ruta de neuroinvasión, el tiempo de incubación o el tiempo de supervivencia.

1.1.1.3 Potencial zoonótico

El scrapie afecta endémicamente rebaños que se utilizan para el consumo humano pero, a pesar de esta exposición dietética, ningún estudio epidemiológico ha identificado una relación directa entre el scrapie y la aparición de EET en humanos. Esto se debe a que existe una barrera de especie que limita la transmisión cruzada de las EET. Sin embargo, lo sucedido con la encefalopatía espongiiforme bovina indica que las EET animales pueden pasar esta barrera y suponer un riesgo significativo para la salud pública. Por esta razón se han realizado diversos estudios para evaluar el potencial zoonótico del scrapie. En dos de ellos, utilizando ratones humanizados y macacos cynomolgus, se ha descrito que el scrapie tiene potencial zoonótico y es transmisible a primates con periodos de incubación de 10 años, es decir, compatibles con su esperanza de vida (Cassard et al. 2014; Comoy et al. 2015). A pesar de estos estudios, la evaluación científica realizada por la European Food Safety Authority en 2015 concluye que no hay evidencia científica de que el scrapie pueda ser transmitido de animales a humanos bajo condiciones de la vida real (EFSA panel on Biological Hazards 2015).

1.1.1.4 Diagnóstico

Al no ser patognomónicos los síntomas del scrapie, el diagnóstico clínico se complica y ha de ser verificado en el laboratorio. Actualmente la mayoría de estos procedimientos, tanto para el scrapie como para el resto de las EETs, se basan en el estudio *post mortem* del tejido nervioso, identificando las lesiones histológicas y la presencia de PrP^{Sc} mediante técnicas inmunoquímicas

(Badiola and Pumarola 2010). Se han desarrollado algunos métodos que permiten realizar un diagnóstico *in vivo* en la fase preclínica (O'Rourke et al. 1998, 2000) pero son muy invasivos y no permiten un diagnóstico rápido, sencillo y económico.

1.2 Exosomas

Las células de organismos multicelulares secretan distintos tipos de vesículas membranosas denominadas vesículas extracelulares. Los exosomas son vesículas extracelulares con un diámetro comprendido entre 30 y 140 nm que se liberan de las células tras la fusión de un cuerpo multivesicular (MVB, multivesicular body) con la membrana plasmática. Están presentes en la mayoría de los fluidos biológicos y son producidos y secretados por gran variedad de tipos celulares (Edgar 2016; Isola and Chen 2017).

1.2.1 Biogénesis exosomal

En las balsas lipídicas, microdominios de la membrana plasmática enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, surgen mediante endocitosis vesículas endocíticas que conducen a la formación intracelular de endosomas tempranos (Figura 2). En estas balsas, por distintos mecanismos, se selecciona un conjunto específico de proteínas.

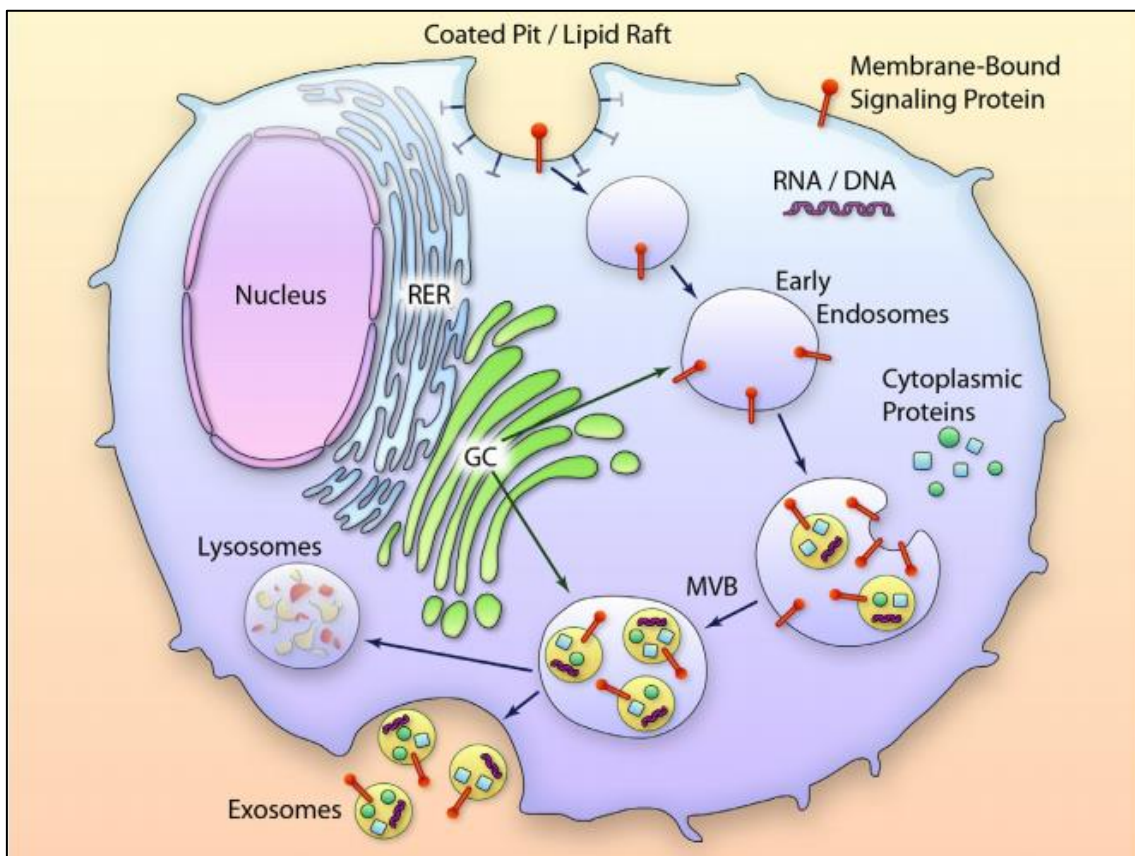


Figura 2. Representación de la biogénesis exosomal. Imagen tomada de *Role of Exosomes in Myocardial Remodeling* (Waldenström and Ronquist 2014).

Una vez formados los endosomas tempranos, son sometidos a un proceso de maduración que incluye una interacción con el aparato de Golgi dando lugar a endosomas tardíos. En la membrana que rodea los endosomas tardíos pueden surgir invaginaciones, dando lugar a vesículas más pequeñas denominadas intraluminales (ILVs, intraluminal vesicles) y formándose un MVB. El proceso de vesiculación que da lugar a estas vesículas internas más pequeñas dentro del MVB es distintivo debido a la dirección de la membrana en gemación, opuesto a la matriz citoplásmica. Finalmente, las ILVs son, o bien dirigidas a los lisosomas para su degradación, o bien liberadas al espacio extracelular como exosomas al fusionarse el MVB con la membrana plasmática. La posterior absorción de los exosomas por parte de otras células dependerá de las proteínas que contengan en su superficie (Isola and Chen 2017; Waldenström and Ronquist 2014).

1.2.2 Carga, función y aplicaciones de los exosomas

Los exosomas se describieron por primera vez en trabajos que estudiaban la maduración de los reticulocitos al observar que estas células emiten pequeñas vesículas para deshacerse de proteínas de membrana que dejan de ser útiles para los eritrocitos maduros (Harding, Heuser, and Stahl 1983; Johnstone et al. 1987). Por esta razón, los primeros artículos sobre exosomas los definen como pequeñas vesículas que secretan las células para descartar proteínas de membrana, actuando como una alternativa a la degradación lisosomal efectiva en la eliminación de proteínas resistentes a la degradación por proteasas lisosomales (Théry, Zitvogel, and Amigorena 2002). Sin embargo, conforme se ha ido avanzando en el estudio de los exosomas se ha visto que tienen muchas otras funciones biológicas

Los exosomas transportan, además de las proteínas de la membrana, otros componentes procedentes del interior celular (Figura 2) incluyendo proteínas, lípidos y material genético (DNA, mRNA y miRNAs). Pueden, por lo tanto, llevar hasta una célula aceptora diversas moléculas funcionales y modular su actividad, desempeñando así un papel fundamental en la comunicación intercelular (Nazimek et al. 2015). Por un lado, son liberados por células sanas, tanto constitutivamente como mediante activación celular, e intervienen en distintas funciones fisiológicas saludables, siendo esenciales, por ejemplo, para la correcta función de los sistemas inmune, nervioso y cardiovascular. Pero, por otro lado, se ha descrito que favorecen el desarrollo patológico y la progresión de numerosas enfermedades. Un ejemplo son las enfermedades infecciosas, ya que se ha visto que algunos patógenos son capaces de utilizar los exosomas para infectar nuevas células evadiendo la respuesta del sistema inmune, pero también se han visto relacionados con enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, hepáticas y cáncer (Isola and Chen 2017).

La carga de los exosomas no es constante, sino que viene determinada por una regulada selección de componentes específicos que permite que cada exosoma ejerza su función. Por tanto es un proceso heterogéneo y dinámico que depende tanto del tipo celular como del estado fisiológico de la célula de la que procede el exosoma. Por esta razón, los exosomas tienen un gran potencial como biomarcadores y se han publicado numerosos estudios que analizan y comparan la carga de los exosomas en individuos sanos y enfermos con el objetivo de desarrollar métodos de diagnóstico no invasivos para distintas enfermedades (Isola and Chen 2017).

Además de su aplicación como biomarcadores, cabe destacar el potencial terapéutico de los exosomas (Nazimek et al. 2015). De hecho, en los últimos años se han propuesto distintas estrategias para su aplicación terapéutica:

- Intentar bloquear los exosomas que median en la comunicación intercelular patológica.
- Modificar su carga *in vitro* y utilizarlos como nanovehículos de agentes terapéuticos que pueden facilitar, bloquear o disminuir una función específica en las células diana.
- Recubrir los exosomas terapéuticos con anticuerpos de especificidad elegida para mejorar la selectividad de la interacción exosoma-célula y reducir los posibles efectos secundarios causados por la carga del exosoma transferido.

1.2.3 Exosomas y enfermedades priónicas

Los exosomas actúan como mediadores en numerosas enfermedades neurodegenerativas al transportar entre células factores que favorecen el desarrollo de la patología. Además, por su estructura y pequeño tamaño, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que les permite alcanzar las células cerebrales (Kalani, Tyagi, and Tyagi 2014). Cabe destacar que se han detectado en exosomas aislados de modelos de enfermedades neurodegenerativas distintas proteínas patológicas como oligómeros del péptido beta-amiloide o la proteína mutante superóxido dismutasa 1 (Basso and Bonetto 2016; Sardar-Sinha et al. 2018).

Si nos centramos en las EETs, tanto PrP^C como PrP^{Sc} se han visto asociadas a exosomas aislados de distintos modelos de estudio de EETs. La mayoría de estos estudios se han realizado *in vitro* en modelos celulares (Alais et al. 2008; Coleman et al. 2012; Fevrier et al. 2004; Vella et al. 2007). También se han realizado trabajos similares *in vivo*, aunque, mientras la PrP^C se ha detectado en exosomas aislados de biofluidos ovinos (Berrone et al. 2015; Vella et al. 2008) y humanos (Ritchie et al. 2013), la PrP^{Sc} solo se ha detectado en exosomas aislados de plasma de modelos murinos (Saá et al. 2014).

1.2.3.1 Propagación de priones en exosomas

Distintas investigaciones han estudiado, utilizando cultivos celulares, los mecanismos de transmisión de los priones entre células, siendo los tres principales el contacto célula-célula (Kanu et al. 2002), los nanotubos de membrana (Gousset et al. 2009) y los exosomas (Fevrier et al. 2004; Vella et al. 2007).

La proteína prión se sintetiza con un péptido señal en el extremo N-terminal y otro en el C-terminal. El primero dirige la proteína al interior de retículo endoplásmico, donde el segundo se escinde y se une glicosilfosfatidilinositol (GPI). Después la PrP^C se traslada al aparato de Golgi, donde los glicanos unidos al extremo N terminal maduran y la proteína se clasifica para el tráfico a la membrana plasmática, donde queda anclada a las balsas lipídicas a través del GPI, y en el caso de haber PrP^{Sc}, se promueve la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} (Cheng, Zhao, and Hill 2018).

Una vez en la membrana tanto PrP^C como PrP^{Sc} pueden pasar a una célula no infectada por contacto célula-célula (Figura 3.1), a través de nanotubos de membrana (Figura 3.2) o ser de nuevo internalizadas por endocitosis en la misma célula (Figura 3.3). Tras la internalización pueden ser recicladas de vuelta a la membrana celular, o bien ser seleccionadas por el sistema de clasificación de proteínas endosomal para ser incorporadas en vesículas intraluminales (Figura 3.4). Las ILVs pueden fusionarse con el lisosoma para su degradación o liberarse al espacio extracelular en forma de exosomas (Figura 3.5) (Cheng, Zhao, and Hill 2018).

Los exosomas pueden viajar a las células vecinas, e incluso secretarse en el torrente sanguíneo (Figura 3.6) y viajar a otros tejidos, donde pueden ser absorbidos por las células receptoras mediante endocitosis (Figura 3.7), fusión con la membrana plasmática (Figura 3.8) u endocitosis mediada por clatrina (Figura 3.9). El contenido de los exosomas se libera en la célula receptora (Figura 3.10), por lo que si los exosomas contienen PrP^{Sc}, esta se inserta en la membrana plasmática de la célula receptora y continua la propagación de la infección. Es decir, los exosomas infectados pueden desencadenar la propagación entre diferentes tejidos mediante su liberación y absorción, lo que demuestra un papel importante para la patogénesis de las enfermedades priónicas (Cheng, Zhao, and Hill 2018). De hecho, en estudios con cultivos celulares se ha visto que utilizando compuestos como GW4869 y Monensin, que inhiban o estimulen la liberación de exosomas, se puede controlar la transmisión intercelular de los priones (Guo, Bellingham, and Hill 2016; Trajkovic et al. 2008).

En los párrafos anteriores se explica la biogénesis exosomal y su relación con la diseminación de PrP a grandes rasgos, pero es un proceso mucho más complejo, pues se ha visto que la infección priónica puede alterar el funcionamiento de distintos sistemas de este proceso,

como el endocítico (Uchiyama et al. 2017) o el de clasificación de proteínas endosomal (Guo, Bellingham, and Hill 2015; McGough and Vincent 2016) para favorecer su propagación. Además se dan diferencias en la alteración de ambos sistemas en función de la cepa priónica (Arellano-Anaya et al. 2014; Fehlinger et al. 2017).

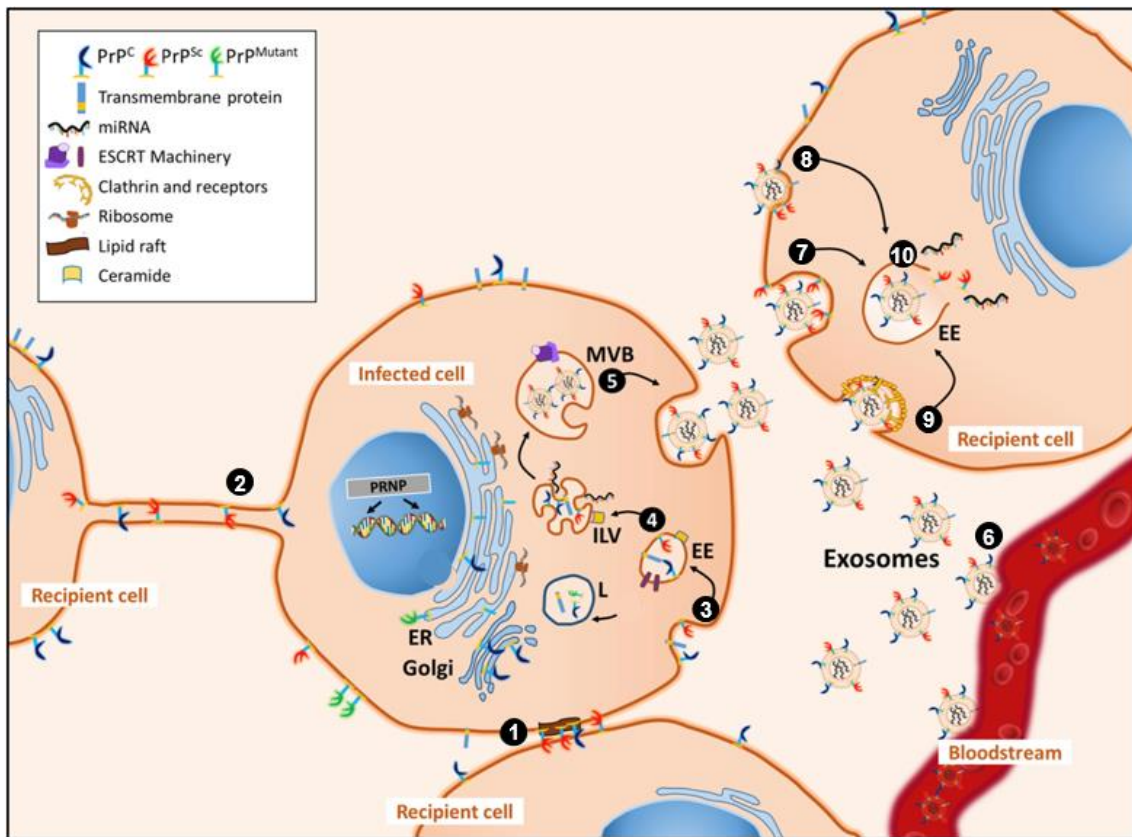


Figura 3. Tráfico intercelular de PrP^C y PrP^{Sc}. Imagen modificada de *Exosomes and Their Role in the Intercellular Trafficking of Normal and Disease Associated Prion Proteins* (Cheng, Zhao, and Hill 2018).

1.2.3.2 Potencial de los exosomas para el diagnóstico de las enfermedades priónicas

Como se ha comentado previamente, todavía no se han desarrollado métodos de diagnóstico *in vivo* efectivos, sencillos y económicos para las EETs por lo que se sigue investigando con ese propósito. Los exosomas además de tener un fuerte potencial como fuente de biomarcadores tienen la ventaja de poder ser fácilmente aislados a partir de los fluidos biológicos. Por estas razones, es de interés estudiar la posible aplicación de los exosomas para el diagnóstico de las EETs.

En 2001 se desarrolló un ensayo *in vitro* muy sensible para la detección de PrP^{Sc} denominado amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA, protein-misfolding cyclic amplification) y que, como su nombre indica, consiste en amplificar cíclicamente bajas cantidades de PrP^{Sc} aprovechando su capacidad de autorreplicación. Cada ciclo se compone de dos fases: durante la primera, la muestra, que contiene cantidades diminutas de PrP^{Sc} y un exceso de PrP^C,

se incubaba para inducir el crecimiento de polímeros de PrP^{Sc} y en la segunda, se sometió a sonicación para romper los polímeros, multiplicando así el número de núcleos infecciosos (Saborio, Permanne, and Soto 2001; Soto, Gabriela, and Anderes 2002). Desde que fue desarrollada, esta tecnología ha sido utilizada por muchos grupos, de tal forma que se ha automatizado, ha ido mejorando en eficiencia y sensibilidad y se ha conseguido detectar PrP^{Sc} en fluidos corporales como plasma, orina o LCR (Barria, Gonzalez-romero, and Soto 2012). Más adelante, se pensó que podría aumentarse todavía más la sensibilidad aislando previamente exosomas de LCR o sangre.

La combinación del aislamiento de exosomas y la realización de PMCA ya se había realizado *in vitro*, demostrando la presencia de PrP^{Sc} en exosomas aislados a partir de medio de cultivo de modelos celulares de EETs. Sin embargo, los bajos niveles de PrP^{Sc} en sangre y los grandes volúmenes de muestra requeridos para el aislamiento de exosomas por el método convencional (ultracentrifugación) complicaban la detección bioquímica *in vivo*, impidiendo su aplicación como método de diagnóstico. Combinando el aislamiento de exosomas mediante kits comerciales y la realización de PMCA se logró la primera evidencia de la presencia de PrP^{Sc} en la fracción exosomal de muestras de plasma de modelos murinos en fases preclínicas y clínicas de la enfermedad priónica (Saá et al. 2014). Sin embargo también se detectó PrP^{Sc} en otras fracciones, por lo que no se demostró que el aislamiento de exosomas fuese ventajoso para el diagnóstico.

Al ser la detección de PrP^{Sc} bastante compleja, en los últimos años los estudios se han redirigido con el objetivo de identificar otros contenidos exosomales que actúen como biomarcadores. Realizando un análisis comparativo del contenido de miRNAs en exosomas de células neuronales control e infectadas con priones se identificó una batería de miRNAs alterados en la enfermedad priónica que incluye: let-7b, let-7i, miR-128a, miR-21, miR-222, miR-29b, miR-342-3p, miR-424 y miR-146a (Bellingham, Coleman, and Hill 2012). Sin embargo, para comprobar la utilidad de cualquier molécula como biomarcador para el diagnóstico de una enfermedad *in vivo* tiene que estudiarse en un hospedador natural de la enfermedad, por lo que sería interesante llevar a cabo la validación de esta batería de miRNAs en muestras clínicas humanas o de modelos animales. Además, el interés del estudio de estos miRNAs no radica únicamente en su potencial uso como biomarcadores, sino también en la posibilidad de que algunos de ellos estimulen la conversión de la PrP^C o estén relacionados de alguna manera con la patogénesis de la enfermedad priónica.

Dado el interés que tiene el estudio de los exosomas tanto para seguir profundizando en el conocimiento sobre las EETs como para la búsqueda de posibles nuevos métodos de diagnóstico para estas enfermedades, en este trabajo se planteó aislar y caracterizar exosomas de LCR de ovejas con scrapie, así como analizar una batería de miRNAs cuya expresión se ha visto alterada en modelos de EETs u otras enfermedades neurodegenerativas, tanto en LCR como en la fracción exosomal de este fluido. La muestra de elección fue LCR porque en un estudio previo del grupo (Sanz-Rubio 2015) ya se caracterizaron los exosomas procedentes de plasma y porque tiene la ventaja de estar en contacto con la zona diana de la enfermedad.

1.3 Modelos celulares para el estudio de las EETs

Las investigaciones sobre EETs pueden realizarse con modelos animales, pero esto conlleva una gran inversión económica. Además estos modelos suelen ser murinos, pues el uso de modelos animales naturalmente susceptibles a estas enfermedades (ovejas, vacas..) es todavía más costoso. Sin embargo, el uso de modelos celulares permite ahorrar tiempo y dinero, por esta razón han sido ampliamente utilizados tanto para el estudio de aspectos básicos de la enfermedad, como para testar posibles tratamientos o métodos de diagnóstico.

Muchas líneas celulares que expresan PrP^C no replican los priones, de hecho sólo unas pocas han podido ser infectadas y mostrar acumulación de PrP^{Sc} y/o infectividad. La mayoría de estas son de origen murino, con la desventaja de que su infección requiere la previa adaptación de la cepa priónica a esta especie, además, solo algunas células del cultivo se infectan y los cambios fenotípicos que les induce la propagación de los priones son muy sutiles. Otros dos modelos celulares que se han utilizado y que resultan más adecuados para estudiar las EETs por proceder de especies naturalmente susceptibles son: cultivos primarios de células cerebrales y células madre. Los primeros son modelos más precisos que las líneas murinas, pero son difíciles de desarrollar y suponen el sacrificio del animal. En cuanto a las células madre, cabe destacar las células madre mesenquimales (mesenchymal stem cells, MSCs) porque pueden aislarse de varios tejidos adultos. Esto supone una importante ventaja frente a las células madre embrionarias, que tienen que aislarse a partir de tejidos embrionarios, lo que conlleva problemas éticos (Mediano et al. 2014, 2015).

En este trabajo se han utilizado muestras procedentes de modelos animales pero, por razones técnicas, económicas y éticas el número de individuos con el que se puede contar para los experimentos es limitado, lo que aporta variabilidad a los resultados. Por esta razón, así como por facilitar el proceso experimental, se propuso implementar un modelo basado en MSCs ovinas para próximas investigaciones.

1.3.1 Células madre mesenquimales

Son células adherentes, con morfología fibroblastoide y de origen mesodermal. Como todas las células madre, se caracterizan por su capacidad de proliferación y diferenciación, pero al ser células madre adultas presentan una capacidad finita de proliferación *in vitro* y no son totipotenciales sino multipotenciales, es decir, solo son capaces de diferenciarse a un número limitado de tipos celulares, en principio a aquellos con el mismo origen embrionario. Por lo tanto, las MSCs pueden diferenciarse a células maduras que derivan del mesodermo como adipocitos, mioblastos, osteoblastos o condrocitos (Ding, Shyu, and Lin 2011; Pittenger et al. 1999).

In vivo, las MSCs se encuentran en los tejidos y órganos de individuos adultos indiferenciadas y en estado quiescente hasta que aparece un estímulo que les hace proliferar y diferenciarse a un determinado tipo celular. *In vitro* se ha conseguido mimetizar este proceso añadiendo a las células medios de cultivo enriquecidos con factores específicos que actúan como inductores de diferenciación (Gimble et al. 2008).

A pesar de ser células multipotenciales, distintos estudios han descrito que las MSCs presentan un alto grado de plasticidad, pudiendo diferenciarse tanto *in vivo* como *in vitro* a tipos celulares no mesodérmicos, entre ellos células del SNC como neuronas y astrocitos (Phinney and Isakova 2005). Dado que este trabajo se centra en una enfermedad neurodegenerativa, resulta de especial interés la transdiferenciación de las MSCs a neuronas, que *in vitro* se ha conseguido utilizando medios enriquecidos con distintos factores como mercaptoetanol, ácido retinoico y dimetilsulfóxido (Mareschi et al. 2006).

La médula ósea es la principal fuente de MSCs pero se ha conseguido aislar y expandir *in vitro* MSCs de numerosos tejidos y órganos adultos (da Silva Meirelles, Chagastelles, and Nardi 2006). El hecho de que puedan ser fácilmente aisladas, junto a su capacidad de proliferación y diferenciación ha supuesto que sean muy estudiadas por su potencial aplicación en terapia celular. Además, tienen la capacidad de migrar a zonas lesionadas, carecen de inmunogenicidad y tienen propiedades inmunoregulatorias, pudiendo inhibir las respuestas inmunes innata y adaptativa, lo que las convierte en las candidatas perfectas para la regeneración de tejidos y el tratamiento de desórdenes inmunológicos. Dadas todas estas características, numerosos investigadores han propuesto la administración de MSCs expandidas *in vitro* como recurso terapéutico para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades así como para el control de respuestas inmunológicas a trasplantes (Qi et al. 2017; Xu and Li 2014).

1.3.2 Células madre mesenquimales y enfermedades priónicas

1.3.2.1 Potencial de las MSCs como modelo para el estudio de las EETs

Se ha descrito que las MSCs murinas son susceptibles a la infección por priones. De hecho, se han conseguido multiplicar distintas cepas priónicas humanas, una vez adaptadas a ratón, utilizando células con características mesenquimales obtenidas a partir de estroma de bazo (Akimov et al. 2008) y médula ósea de ratón (Akimov et al. 2009). Además no es necesaria la diferenciación de las MSCs a células neuronales para que puedan multiplicar los priones (Cervenakova et al. 2011).

La capacidad de diferenciación de las MSCs a células del SNC, su susceptibilidad a la infección priónica y su fácil obtención a partir de tejidos de individuos adultos las convierte en las candidatas perfectas para el desarrollo de modelos para el estudio *in vitro* de las EETs con células procedentes de los hospedadores naturales de estas enfermedades.

En estudios previos del grupo se aislaron y caracterizaron MSCs de sangre y médula ósea de ovino sano y con scrapie. Ambos tipos eran capaces de transdiferenciarse hacia neurona y no se observaron cambios importantes asociados a la enfermedad. Las MSCs aisladas de ovino con scrapie no mostraron la presencia de PrP^{Sc} (Mediano et al. 2015). Por otro lado, en otro trabajo de este mismo grupo se infectaron MSCs ovinas con scrapie *in vitro* y se observó tendencia a la significación para la multiplicación del prión cuando estas habían sido sometidas a diferenciación neurogénica (Mendivil-García 2016). Como estos resultados no fueron concluyentes, en este TFM se ha propuesto estudiar la capacidad para multiplicar el prión de MSCs procedentes de ovejas con distintos genotipos para el gen *PRNP* tanto en condiciones de cultivo estándar como de diferenciación neurogénica.

1.3.2.2 Potencial de las MSCs como terapia celular frente a las EETs

Además de por su capacidad de diferenciación a células del SNC, las MSCs tienen un gran potencial como terapia celular frente a lesiones en este sistema porque liberan factores que reducen la inflamación y promueven la angiogenesis, la neurogenesis, y la plasticidad sináptica (Chen and Chopp 2006), previniendo la degradación neuronal y favoreciendo la regeneración del tejido dañado. Por esta razón se ha estudiado su capacidad para mejorar la recuperación tras ictus (Yang et al. 2014), lesiones cerebrales traumáticas (Hasan et al. 2017) o lesiones de la médula espinal (Dasari, Veeravalli, and Dinh 2014) y se han propuesto como terapia para distintas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Gugliandolo, Bramanti, and Mazzon 2017) o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Lewis and Suzuki 2014).

Entre los trabajos que han estudiado el potencial terapéutico de las MSCs en EETs, cabe destacar el trasplante de MSCs humanas en ratones infectados con priones (Song et al. 2009). En los ratones trasplantados se observó una migración de las MSCs hacia las zonas con lesión cerebral así como un leve aumento en los tiempos de supervivencia. El mismo grupo describió posteriormente los factores quimiotácticos responsables de la migración de las MSCs hacia las lesiones cerebrales causadas por priones (Song et al. 2011).

2. OBJETIVOS

En trabajos anteriores, el grupo de investigación aisló y caracterizó exosomas procedentes de sangre periférica de ovino con scrapie y demostró que, al contrario de lo que parece ocurrir en modelos murinos, los exosomas de plasma de ovino con scrapie no presentan la proteína príon patológica (PrP^{Sc}). Recientemente, este grupo ha detectado PrP^{Sc} en exosomas de LCR de ovino con scrapie. En este TFM se pretende caracterizar los exosomas obtenidos a partir de LCR de ovino con scrapie y control, con el fin de encontrar posibles biomarcadores para el diagnóstico de las EETs.

Por otro lado, el grupo LAGENBIO ha realizado estudios previos que inducen a pensar que las células mesenquimales (MSCs) ovinas sometidas a diferenciación neurogénica podrían multiplicar el príon, y dado que el desarrollo de modelos celulares procedentes de especies naturalmente susceptibles facilitaría la investigación de las EETs, se planteó como segundo gran objetivo del trabajo implementar este modelo mediante la diferenciación neurogénica de cultivos con genotipos altamente susceptibles a la infección por priones en ovino.

Para conseguir estos dos objetivos generales se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Aislar exosomas a partir de LCR de ovino con scrapie y control y caracterizarlos analizando su morfología y la presencia de marcadores específicos de exosomas.
2. Analizar en LCR de ovino y en los exosomas aislados los perfiles de expresión de una batería de miRNAs cuya expresión se ha visto alterada en modelos de EETs u otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.
3. Cultivar y someter a diferenciación neurogénica MSCs provenientes de médula ósea de ovejas con genotipos altamente susceptibles a la infección con priones.
4. Caracterizar los distintos cultivos analizando la tasa de proliferación celular y los niveles de expresión de una batería de genes que se han visto asociados a la replicación priónica.
5. Estudiar si al inocular las MSCs cultivadas en condiciones estándar de crecimiento con extractos cerebrales de ovejas, tanto sanas como enfermas de scrapie, se ve alterada su tasa de proliferación.
6. Infectar MSCs con scrapie ovino, tanto en condiciones estándar de crecimiento como en condiciones neurogénicas y estudiar tanto la posible multiplicación del príon como el efecto de la infección en la expresión de una serie de genes relacionados con la replicación priónica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras

Las muestras de **LCR** fueron obtenidas del banco de tejidos del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CIEETE) y del Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y se mantenían criopreservadas a -80°C hasta su utilización. Estas muestras procedían de ovinos sanos procedentes de rebaños en los que nunca se ha presentado la enfermedad y de ovinos infectados con scrapie de forma natural procedentes de distintos rebaños regionales. Todos los animales eran hembras, de la raza Rasa Aragonesa, con edades de entre 2 y 8 años y genotipo para el gen *PRNP* ARQ/ARQ.

Las **MSCs** utilizadas en el estudio habían sido aisladas de la médula ósea de 3 ovejas, de un año de edad de raza Rasa Aragonesa, con distintos genotipos para el gen *PRNP* (ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ) y se les denominó células AA, VV y AV respectivamente. Se encontraban criopreservadas en nitrógeno líquido en el banco de células de LAGENBIO a una concentración de 1,5 millones de células en 1 ml (90% suero fetal bovino +10% Dimetilsulfóxido).

Los **inóculos de extracto cerebral** (10%) se encontraban criopreservados en el banco de tejidos del CIEETE. El inóculo negativo (I-) estaba compuesto por una mezcla de extracto cerebral de 2 ovejas Rasa Aragonesa sanas de 9 y 10 meses de edad con genotipos ARQ/ARQ y VRQ/VRQ. El inóculo positivo (I+) por una mezcla de extracto cerebral de 3 ovejas Rasa Aragonesa de entre 2,5 y 3 años con genotipos ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ infectadas con scrapie.

3.2 Aislamiento y preservación de exosomas

La extracción de exosomas se realizó utilizando los siguientes kits comerciales:

- Total Exosome Isolation (from other body fluids) (Invitrogen)
- miRCURY exosome isolation kit – Cells, Urine & CSF (Exiqon).

En ambos casos se siguió el protocolo indicado por el fabricante, a excepción de la dilución final del pellet, para la que se utilizó PBS en lugar de las soluciones de resuspensión incluidas en los kits.

Una vez finalizado el proceso, los exosomas purificados eran conservados a 4°C si iban a ser utilizados antes de 48 horas o almacenados a -80°C para análisis posteriores.

3.3 Caracterización de exosomas

Con el objetivo de confirmar la presencia de exosomas en las diluciones finales obtenidas con los kits comerciales de extracción de exosomas citados en el apartado anterior (3.2), se realizaron las siguientes tres técnicas:

3.3.1 Análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión (TEM, transmission electron microscopy)

La preparación de las muestras de exosomas se realizó en el servicio de microscopía electrónica de sistemas biológicos de la Universidad de Zaragoza. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% durante 30 minutos, contrastadas con acetato de uranilo (2%) y embebidas en una solución de acetato de uranilo (0.4%) y metilcelulosa (0.13%).

La observación de las muestras por TEM y la captura de imágenes digitalizadas se realizaron en el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA). Para la visualización se utilizó un microscopio electrónico de transmisión *Tecnai T20* (FEI Company) con un filamento de hexaboruro de lantano, un voltaje de trabajo de 200KV y una cámara *CCD 2Kx2K Veleta model* (Olympus) para la captura de imágenes.

3.3.2 Dispersión dinámica de luz (DLS, dynamic light scattering)

La muestra de exosomas a analizar era introducida en una cubeta en el interior del analizador de tamaño de partículas *NanoBrook 90Plus PALS Particle Analyzer* (Brookhaven Instruments Corporation) del INA. Una vez en el equipo era incidida por un láser diodo de 35 mW que permite discriminar tamaños de partícula desde 0,3 nm hasta 6 μm .

3.3.3 Western-Blot

En un estudio anterior con exosomas aislados de plasma se observó que la cantidad idónea de proteína total a cargar de cada muestra en los geles de poliacrilamida para la realización de la técnica era de 25 μg , por lo que, en primer lugar, se estimó la concentración de proteína de las muestras de exosomas por el método del ácido bicinconínico o BCA (B9643, C2284, Sigma). Para la lectura de absorbancias se utilizó el lector de placas *Infinite F200* (Tecan Ibérica Instrumentación) y para realizar la recta patrón y calcular las distintas concentraciones el programa *Microsoft Excel*.

Los geles se prepararon con un porcentaje de acrilamida del 5% en el caso del gel concentrador y del 12% en el del gel separador (Anexo 1, Tabla 1). Una vez preparados y calculado el volumen de cada muestra necesario para cargar 25 μg de proteína total, se procedió

a preparar las muestras. Para ello se mezclaron en las proporciones adecuadas con el tampón de carga y se sometieron a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. A continuación se cargaron las muestras en el gel, se realizó una electroforesis a 120V en una celda *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BIO-RAD) y se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno *Hybond-P* (GE Healthcare Life Sciences) en una cubeta *Mini TransBlot cell* (BIO-RAD) con un amperaje de 0,2 A durante 60 minutos.

Una vez finalizada la transferencia se realizaron tres lavados de la membrana de 5 minutos con TTBS (Anexo 1, Tabla 2) y el bloqueo con una solución de leche desnatada en polvo 5% en TTBS (solución de bloqueo) durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario *anti-CD81 mouse monoclonal IgG sc-70803* (Santa Cruz) diluido 1:200 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario *anti-mouse goat IgG-HRP sc-2005* (Santa Cruz) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos con TTBS, se cubrió la membrana con *Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate* (Millipore), se dejó actuar 5 minutos y se reveló la membrana en un equipo *Versadoc™ Imaging System* (BIO-RAD). La composición de las soluciones utilizadas en esta técnica está descrita en el Anexo 1 (Tabla 2).

3.4 Evaluación del perfil de miRNAs

Se realizaron ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para obtener una cuantificación relativa de la presencia de distintos miRNAs en muestras de ovejas enfermas frente a muestras de ovejas control. Estos análisis se hicieron en muestras de: LCR, exosomas aislados de LCR (EXO) y LCR sin la fracción exosomal (LCR-EXO). Las sondas y primers empleados en este proceso se muestran en el Anexo 2 (Tabla 1).

3.4.1 Extracción de RNA

Para evitar la degradación del RNA durante la extracción, se limpió la superficie de trabajo, se utilizaron puntas con filtro y material exclusivo para el trabajo con RNA.

La extracción del RNA de las muestras se llevó a cabo mediante los siguientes kits comerciales, siguiendo las indicaciones de los fabricantes:

- LCR y LCR-EXO: *Total RNA Purification Kit* (Norgen).
- EXO: *miRCURY RNA Isolation Kit-Cells and plants* (Exiqon).

Debido a la ausencia de miRNAs normalizadores, con el fin de normalizar los resultados de amplificación, se añadió una preparación del miRNA *Spike-in cel-miR-39* del kit *miRCURY Universal microRNA PCR system, RNA Spike-in kit* (Exiqon). Una vez extraído el RNA, se realizó la retrotranscripción a cDNA como se explica a continuación.

3.4.2 Retrotranscripción a cDNA

Se realizó la retrotranscripción a partir de las muestras de RNA total utilizando primers *stem-loop* comerciales de *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied biosystems) específicos para cada miRNA a analizar y los reactivos del kit comercial *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied biosystems). Se siguieron las indicaciones del fabricante. Se realizó la retrotranscripción de todos los miRNAs a analizar en una única reacción, por lo que inicialmente se realizó un pool con los primers de todos ellos.

3.4.3 RT-qPCR

Los productos de PCR fueron amplificados en placas de qPCR de 96 pocillos y en un volumen final de reacción de 5 μ L consistente en:

- 2,5 μ L del reactivo *TaqMan 2X Universal PCR Master Mix* (Applied biosystems).
- 0,25 μ L del mix *TaqMan microRNA Assay 20X* (Applied biosystems), una mezcla de los primers y sonda TaqMan MGB específicos para el miRNA a amplificar.
- 2,25 μ L del cDNA obtenido en el paso anterior diluido previamente 1:5 en agua, o de agua, en el caso de los controles negativos.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se agitó la placa durante 30 segundos y se centrifugó antes de introducirla en un equipo *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), donde se llevó a cabo la reacción de amplificación con el siguiente programa: 20 segundos a 95°C y 40 ciclos de 1 segundo a 95°C y 20 a 60°C. Cada una de las reacciones se realizó por triplicado.

3.4.4 Análisis de expresión y estadístico

Para realizar una cuantificación relativa de los miRNAs en las ovejas con scrapie frente a las control, se analizaron los datos mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). Este análisis y las gráficas fueron realizados con el programa *Microsoft Excel*.

A partir de los datos obtenidos con el programa *StepOnePlus™ v2.3* se extrajeron los valores de ciclo umbral (*Ct, cycle threshold*) de todas las reacciones y se calculó la media de los tres valores obtenidos para cada miRNA en cada muestra. A este valor se le restó la media de

los Ct del *Spike-in cel-miR-39* en la muestra correspondiente, obteniéndose el valor ΔCt . A continuación, se realizó para cada miRNA la media de ΔCt de cada grupo (scrapie y control) y se sustrajo la media de los controles a la de ambos grupos para obtener los valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$. Finalmente, se realizó la conversión $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para conseguir una relación lineal. Los valores de error representados por las barras de error también fueron determinadas utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ tal y como viene explicado en el artículo publicado por Livak and Schmittgen en 2001.

Los resultados se analizaron mediante dos test estadísticos, el test de Grubbs para detectar valores anómalos en cada grupo (outliers) y el de t de Student para valorar la existencia de diferencias significativas entre los grupos, fijando un nivel de significación estadística de $P < 0,05$.

3.5 Mantenimiento y expansión de los cultivos celulares

Las células se encontraban en pase 2 tras el aislamiento. Para obtener el número suficiente para la realización de los distintos experimentos se expandieron uno o dos pases más en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, Penicilina-Streptomycin(Sigma-Aldrich) al 1% y L-glutamina(Sigma-Aldrich) al 1% y en una estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. Tras la siembra a una densidad de 5000 células/cm² se mantenían los cultivos cambiando el medio cada 3 o 4 días. Cuando se alcanzaba una confluencia de aproximadamente 80%, se tripsinizaban y se contaban y, en caso necesario, se subcultivaron a una concentración de 5000 células/cm².

El trabajo con células fue realizado en todo momento bajo condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica.

3.6 Análisis de expresión génica

Para analizar la expresión de los genes de interés en las MSCs se utilizó RT-qPCR. En primer lugar se cultivaron, en placas de 6 pocillos y a una densidad de 5000 células/cm², 3 réplicas de cada cultivo de MSCs (AA, VV y AV) en condiciones estándar de crecimiento (las descritas en el apartado 3.5) y 3 réplicas sometidas a un proceso de diferenciación neurogénica con el medio comercial *PSC neural induction medium* (Gibco).

Una vez finalizado el proceso de diferenciación, se tomaron las células de cada pocillo independientemente y se obtuvo su cDNA utilizando el kit comercial *Cells-to-cDNA™ II Kit* (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Los productos de PCR fueron amplificados en una placa de RT-qPCR con un volumen final de reacción de 10 μL en cada pocillo:

- 5 μL del reactivo Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems)

- 0,15 μ L del primer directo específico del gen a amplificar (Anexo 2, Tabla 2)
- 0,15 μ L del primer directo específico del gen a amplificar (Anexo 2, Tabla 2)
- 2,7 μ L de H₂O
- 2 μ L del cDNA obtenido, diluído previamente 1:5 en agua, o de agua, en el caso de los controles negativos.

La reacción se llevó a cabo en un equipo *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 20 segundos a 95°C y 40 ciclos de 1 segundo a 95°C y 20 a 60°C, más una etapa adicional para obtener la curva de disociación y poder comprobar que los resultados obtenidos no estaban alterados por señales inespecíficas. Cada una de las reacciones se realizó por triplicado.

El análisis de los datos se llevó a cabo como se ha explicado previamente en el apartado 3.4.4 para cuantificar la expresión de cada gen en cada cultivo sometido a diferenciación neurogénica (N) respecto a la expresión en el cultivo correspondiente en condiciones de crecimiento estándar (C). En este caso, se utilizó como normalizador la expresión del gen housekeeping *ACTB*.

3.7 Estudios de proliferación celular

La proliferación celular se cuantificó mediante ensayos MTT.

Se sembraron réplicas de los cultivos AA, VV y AV en una placa de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 5000 células/cm², dejando pocillos sin sembrar para utilizar como blanco. Las células se mantuvieron en condiciones estándar de crecimiento durante 5 días y al 6º día se realizó la inoculación. Unas réplicas se trataron con el inóculo negativo (I-), otras con el positivo (I+), y otras no fueron inoculadas. Pasadas 48 horas se retiraron los medios, se realizaron lavados y se siguió cultivando las células en condiciones estándar de crecimiento.

A los 7 días postinoculación se procedió a realizar la lectura de viabilidad celular por MTT. Sin retirar el medio se añadió a las células 25 μ L de MTT (2 mg/mL) por pocillo y se incubaron 4 horas en la estufa de cultivo a 37°C. Pasado este tiempo se retiró el medio volteando la placa con un golpe seco, se añadieron 150 μ L de HCl (40 mM en isopropanol) por pocillo y se incubaron las células 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se agitó la placa y se midió la absorbancia a 570 nm (MTT) y 690 nm (fondo) en el lector de placas *Infinite F200* (Tecan Ibérica Instrumentación).

El análisis estadístico y las gráficas fueron realizados con el programa *Microsoft Excel*. Al valor de absorbancia a 570nm de cada pocillo se le substrajo el valor de absorbancia a 690nm.

A continuación se calculó la media de los pocillos utilizados como blanco (solo DMEM) y se substrajo al valor de cada pocillo. Una vez realizados estos cálculos se estimaron los porcentajes de viabilidad. Para comparar la proliferación de los distintos cultivos sin inocular se consideró que el porcentaje de viabilidad del cultivo con menor proliferación era del 100%. Para comparar la proliferación de cada cultivo cuando era inoculado respecto a la proliferación del mismo sin inocular, se consideró que el porcentaje de viabilidad de los cultivos sin inocular (control, C) era del 100%.

3.8 Infección de MSCs con inóculo cerebral de ovino con scrapie

Se subcultivaron, en placas de 6 pocillos y a una densidad de 5000 células/cm², 9 réplicas de cada cultivo de MSCs (AA, VV y AV) en condiciones estándar de crecimiento y 9 réplicas sometidas a un proceso de diferenciación neurogénica con el medio comercial *PSC neural induction medium* (Gibco). 5 días después de sembrar las células se infectaron todos los cultivos con el inóculo positivo. El inóculo se mantuvo 48 horas en contacto con las células, pasado este tiempo se retiró y se realizaron lavados con PBS. A distintos tiempos tras la infección (T1, T2 y T3; 2, 4 y 7 días respectivamente), se tripsinizaron 3 de las réplicas de cada cultivo en cada condición y se congelaron los pellets obtenidos a -80°C. Durante los días post-infección se realizaron lavados con PBS y cambios de medio cada dos días.

Para estudiar la posible multiplicación del prión se realizó un test ELISA para determinar la concentración de PrP^{Sc} a T1, T2 y T3. Además se analizó por qPCR la expresión de genes asociados a la replicación al prión en las MSCs a T3 con el fin de comprobar si se veía alterada con respecto a su expresión en las MSCs sin infectar.

3.8.1 Determinación de PrP^{Sc}

Una vez finalizado el proceso de cultivo e infección arriba descrito, se descongelaron las células y se procedió a determinar la cantidad de PrP^{Sc} mediante el test ELISA comercial *HerdChek* Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Scrapie Antigen Test Kit* (IDEXX). Se siguió el protocolo de ensayo indicado por el fabricante.

Con el fin de comprobar que, a las concentraciones de PrP^{Sc} detectadas, la relación absorbancia/concentración era lineal, se analizaron muestras de concentraciones decrecientes de inóculo cerebral positivo y se realizó una recta de calibrado (Figura 4).

Finalmente, se analizaron los datos para evaluar la evolución de la concentración de PrP^{Sc} con el tiempo en los distintos cultivos en las 2 condiciones de cultivo (C y N). El análisis de los datos y las gráficas fueron realizados con el programa *Microsoft Excel*. Para valorar la existencia

de diferencias significativas entre los grupos (T1, T2 y T3) se utilizó el test estadístico t de Student.

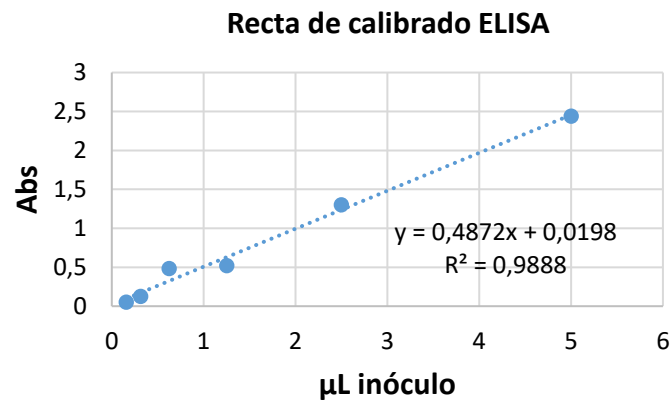


Figura 4. Recta de calibrado ELISA. Realizada analizando muestras de concentraciones decrecientes de inóculo cerebral.

3.8.2 Análisis de genes post-infección

Para analizar el efecto de la infección en la expresión de una serie de genes asociados a la replicación priónica se repitió el ensayo descrito en el apartado 3.6 pero, en este caso, partiendo de las células congeladas a T3.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y caracterización de exosomas

Para llevar a cabo el estudio y aplicación de los exosomas es esencial aislarlos de restos celulares y otras impurezas, en cantidad y pureza considerables, y a partir de distintos tipos de muestras. Se han desarrollado numerosas técnicas de aislamiento, cada una de las cuales explota una característica particular de los exosomas como su densidad, forma, tamaño, proteínas de superficie, etc. Todas ellas tienen unas determinadas ventajas y desventajas. En este estudio se eligió el uso de kits comerciales de precipitación por ser fáciles de utilizar y no requerir equipamiento especializado. Los métodos de precipitación exosomal consisten en alterar la solubilidad o dispersabilidad de los exosomas utilizando polímeros como el polietilenglicol, que unen moléculas de agua y fuerzan a los componentes menos solubles a salir de la solución. Una gran desventaja de estos métodos es la co-precipitación de contaminantes no exosómicos, como proteínas y los materiales poliméricos, pues, por esta razón, se requieren pasos de limpieza previos y posteriores al aislamiento que alargan el proceso (Li et al. 2017).

Los medios de cultivo y los fluidos biológicos a partir de los cuales se aíslan los exosomas pueden contener fragmentos de membrana y distintos tipos de vesículas, por lo que antes de realizar cualquier análisis es importante llevar a cabo una caracterización e identificación de los exosomas y su contenido para asegurarse de que se han purificado exosomas y no otro tipo de vesículas o partículas (Lässer, Eldh, and Lötvald 2012; Théry et al. 2006).

En este trabajo, para confirmar la presencia de exosomas en las diluciones finales obtenidas con los kits, se realizaron tres técnicas: Microscopía electrónica (TEM, transmission electron microscopy) y dispersión dinámica de luz (DLS, dynamic light scattering) para analizar su morfología y Western-Blot para estudiar su contenido proteico.

4.1.1 Detección de marcadores proteicos

Para confirmar la presencia de exosomas en una muestra es preciso detectar proteínas siempre presentes en exosomas, como CD81. Con esta finalidad se utilizó la técnica western blot, que permite confirmar la presencia de una determinada proteína en una muestra. Sin embargo no fue posible detectarla en las muestras de exosomas.

Los resultados obtenidos al analizar por BCA la cantidad de proteína en las soluciones finales de exosomas indicaban que no había suficiente proteína para alcanzar la cantidad óptima de 25µg para hacer el western blot. De todas formas se puso a punto la técnica con extracto de

cerebro, donde se obtuvieron resultados positivos. Sin embargo, a pesar de haber cargado toda la muestra obtenida en el aislamiento, no se observó inmunoreacción para las soluciones de exosomas (Anexo 1, Figura 1). Cabe destacar que los pocos trabajos encontrados en la bibliografía que han descrito el aislamiento de exosomas a partir de LCR parten de volúmenes iniciales de muestra mucho mayores (Street et al. 2012; Vella et al. 2008; Welton et al. 2017).

4.1.2 Análisis morfológico

La identificación de vesículas de membrana como los exosomas requiere, además de la detección de marcadores proteicos, la realización de análisis morfológicos. Dado su pequeño tamaño, para su visualización hay que utilizar técnicas microscópicas de alta resolución como TEM o microscopía de fuerzas atómicas (Jung and Mun 2018; Théry et al. 2006).

En este caso se utilizó TEM para caracterizar los exosomas y evaluar la pureza de las diluciones finales. El ensayo se realizó con 4 muestras de exosomas procedentes de 2 ovejas control aisladas con cada uno de los 2 kits. Cabe destacar que fue difícil encontrar los exosomas porque había muy pocos en las diluciones, lo que coincide con la baja concentración proteica determinada por BCA.

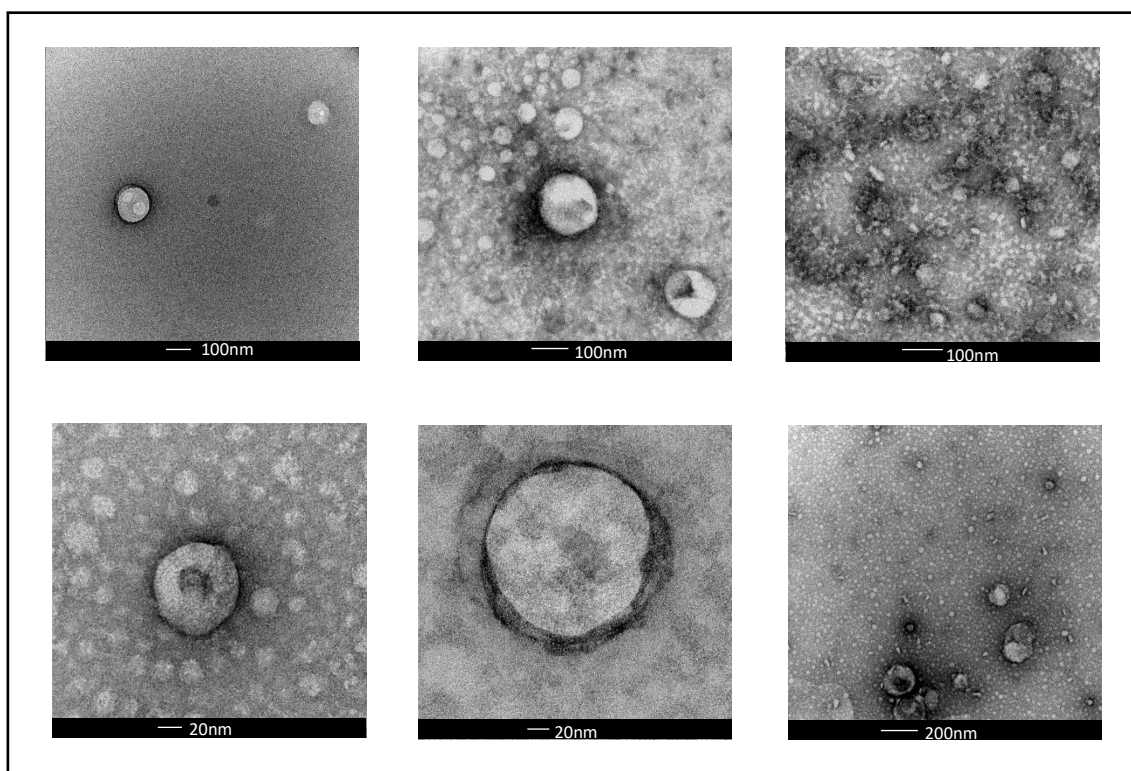


Figura 5. Caracterización morfológica de exosomas de LCR de ovino por TEM. Exosomas extraídos de muestras de LCR de dos ovejas sanas con los kits Total Exosome Isolation (from other body fluids) (arriba) y miRCURY exosome isolation kit – Cells, Urine & CSF (abajo).

Las imágenes obtenidas por TEM (Figura 5) muestran partículas rodeadas de membrana con diámetros comprendidos entre los 30 y los 140 nm característicos de los exosomas. Además, estas partículas presentaban una apariencia similar a las observadas por TEM en diversas publicaciones y descritas como exosomas (Bard et al. 2004; Kapsogeorgou et al. 2005). En el análisis de exosomas por TEM también se ven a menudo partículas lipídicas más pequeñas de 10 a 20 nm dentro de las mismas preparaciones (Théry et al. 2006), de hecho, en muchas de las imágenes obtenidas en este trabajo (Figura 5) se observan figuras más pequeñas, probablemente debido a la presencia de impurezas en las soluciones finales.

En general, estos resultados parecen indicar que sí que se aislaron los exosomas a partir del LCR, aunque no completamente purificados y a una concentración muy baja.

Otro aspecto a recalcar es que alrededor de alguno de los exosomas se ve una fuerte tinción que se ha atribuido a la presencia de un halo filamentoso de material cargado de unos 10-30 nm de espesor que rodea las vesículas (Kesimer et al. 2009).

4.1.3 Distribución de tamaño de partícula

Para la caracterización de los exosomas también resulta interesante utilizar técnicas de análisis de seguimiento de nanopartículas, que proporcionan el diámetro de un gran número de vesículas individualmente. Sin embargo, los resultados de estas técnicas siempre tienen que compararse con los obtenidos por técnicas como TEM o AFM ya que no son capaces de distinguir vesículas de membrana de otras partículas no membranosas de tamaño similar (Lötvald et al. 2014).

Una de estas técnicas es el DLS, que consiste en analizar las variaciones de intensidad de dispersión de la luz que se producen al hacer incidir un láser sobre una solución de las partículas a estudiar. De esta forma se puede determinar el coeficiente de difusión traslacional de las partículas, y a partir de este, estimar su tamaño (Stetefeld, McKenna, and Patel 2016). Hay que tener en cuenta que el diámetro que se obtiene con esta técnica, denominado diámetro hidrodinámico, suele ser superior al que se mide por TEM.

Se realizaron análisis de cuatro muestras con DLS (exosomas de 2 ovejas control aislados con cada uno de los 2 kits de extracción de exosomas de LCR utilizados). A diferencia de lo descrito en plasma ovino (Sanz-Rubio 2015), no se obtuvieron resultados analizables para el LCR por ser la concentración de partículas demasiado baja.

4.2 Análisis comparativo del perfil de expresión de miRNAs en muestras de ovino control y con scrapie

Se utilizó RT-qPCR para realizar un análisis comparativo del perfil de expresión de distintos miRNAs entre animales sanos y enfermos con el objetivo de identificar posibles biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades priónicas. Se eligió una batería de 6 miRNAs cuya expresión ya se ha descrito alterada en modelos de enfermedades priónicas y otras enfermedades neurodegenerativas: miR-486-5p, miR-342-3p, miR-146a-5p, miR-132-3p, miR-128-3p, miR-21-5p (Bellingham, Coleman, and Hill 2012; Lungu, Stoica, and Ambrus 2013; Nagaraj et al. 2017; Saba et al. 2008) y se analizaron en LCR y en exosomas extraídos de LCR de ovejas con scrapie y sanas.

Como se puede observar en la Figura 6, en LCR se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ovejas enfermas y sanas para los niveles de miR-486-5p, miR-146a-5p y miR-21-5p, con una tasa de cambio en ovino con scrapie de 6.02, 4.01 y 5.88, respectivamente. Curiosamente, en un estudio similar realizado anteriormente en el grupo, con plasma en lugar de LCR, se observó igualmente un aumento significativo del miR-21-5p en las muestras de ovejas con scrapie respecto a las control (Sanz-Rubio et al. 2017). Los niveles de miR-486-5p aumentan significativamente en plasma de pacientes con Alzheimer (Nagaraj et al. 2017), lo que sugiere que este miRNA puede estar relacionado con la neurodegeneración. En cuanto al miRNA 146a, se ha visto desregulado en distintos modelos de enfermedad priónica. Aumenta en cerebros de ratones infectados (Saba et al. 2008) mientras que disminuye en células neuronales infectadas por priones y en los exosomas secretados por estas (Bellingham, Coleman, and Hill 2012). Este miRNA podría intervenir en la patogénesis priónica por distintas vías. Por un lado, parece que regula la expresión de la PrP al tener como diana la región 3'UTR del gen *PRNP* (Bellingham, Coleman, and Hill 2012) y, de hecho, la administración de miméticos de miR-146 sintéticos cargados en exosomas disminuye la expresión de la PrP en modelos murinos (Kalani et al. 2017). Por otro lado, se ha descrito que regula genes implicados en la inflamación, y se sabe que la respuesta inmune innata interfiere con la progresión de la enfermedad priónica (Saba et al. 2012).

A diferencia del plasma, donde se observó un aumento significativo de los niveles de miR-342-3p en ovino con scrapie (Sanz-Rubio et al. 2017), en LCR ni miR-342-3p, ni miR-128-3p mostraron diferencias significativas (Figura 6) aunque si se observa, en ambos casos, una tendencia a la significación de aumento de expresión en las ovejas enfermas.

Aunque no se pudo realizar el análisis comparativo de miR-132-3p porque estaba por debajo del límite de detección en varias de las muestras, cabe destacar que, mientras que en todos los controles ocurría esto, los niveles de en 5 de 6 de las muestras de ovejas positivas fueron detectables, lo que indica que este miRNA también se ve aumentado en scrapie.

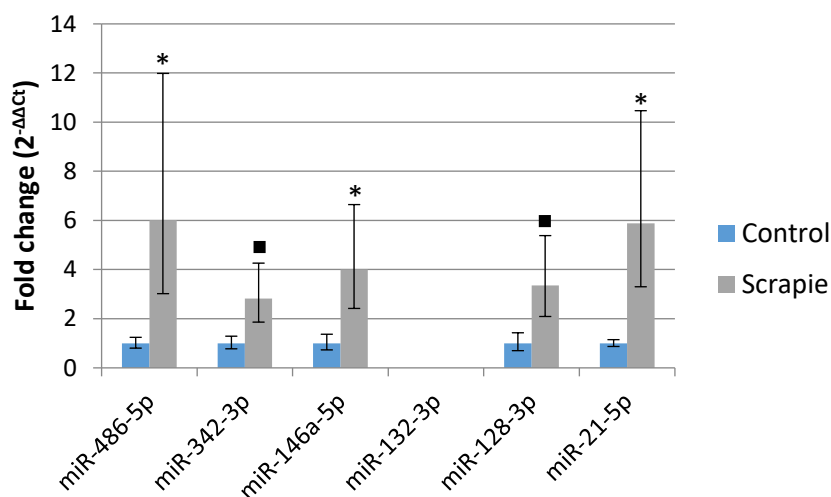


Figura 6. Expresión relativa de miRNAs en LCR de ovino sano y con scrapie. Las barras grises muestran la cantidad relativa de cada miRNA, calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a partir de datos obtenidos por RT-qPCR, en muestras de LCR de ovejas con scrapie, respecto a la cantidad detectada en ovejas control sanas (azul). Las barras de error representan el error estándar (n=6). Significación estadística respecto al control: t de Student (* $P < 0.1$ tendencia, * $P < 0.05$).

En los exosomas solo se pudo analizar la expresión de dos miRNAs, miR-486-5p y miR-342-3p, y para ninguno de ellos se observaron diferencias significativas entre ovejas sanas y enfermas (Figura 7). El resto de miRNAs no se pudieron cuantificar porque o no se amplificaron o estaban a niveles muy bajos, por debajo del límite de detección. Cabe destacar el miR-486-5p por presentar niveles muy altos, lo que parece indicar que este miRNA es abundante en los exosomas.

Bellingham y colaboradores en 2012 consiguieron estudiar y comparar el perfil de miRNAs de exosomas liberados por células neuronales control e infectadas por priones (Bellingham, Coleman, and Hill 2012). Además, obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos para algunos de los miRNAs, incluidos algunos de los analizados en este trabajo (miR-128, miR-21, miR-342 y miR-146). Hay que tener en cuenta que las muestras que analizaron no procedían de fluidos biológicos sino de cultivos celulares sometidos a medios que promueven la liberación de exosomas, y por tanto la concentración exosomal era mayor. De esta forma, a pesar de la baja cantidad de miRNAs que contiene cada exosoma, los niveles eran detectables dado el gran número de exosomas en las muestras.

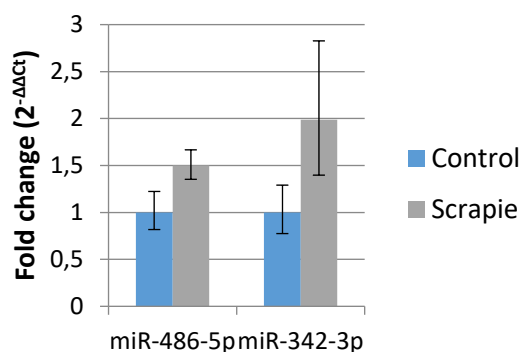


Figura 7. Expresión relativa de miRNAs en exosomas de LCR de ovino sano y con scrapie. Las barras grises muestran la cantidad relativa de cada miRNA, calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a partir de datos obtenidos por RT-qPCR, en muestras de exosomas de LCR de ovejas con scrapie, respecto a la cantidad detectada en ovejas control sanas (azul). Las barras de error representan el error estándar ($n=6$).

En los análisis realizados en el LCR tras aislar la fracción exosomal se observó, en general, una menor cantidad de miRNAs. Esto podría explicarse porque hay que manipular las muestras para extraer los exosomas y en este proceso han podido degradarse. A excepción de la cantidad, los resultados (Figura 8) fueron similares a los obtenidos en LCR, los miRNAs analizados tienden a ser más abundantes en los animales enfermos, obteniéndose en este caso diferencias significativas para dos de ellos: miR-146a-5p y miR-21-5. Al igual que en LCR, no se pudo analizar la expresión de miR-132-3p porque en las muestras de ovejas control la señal estaba por debajo del límite de detección.

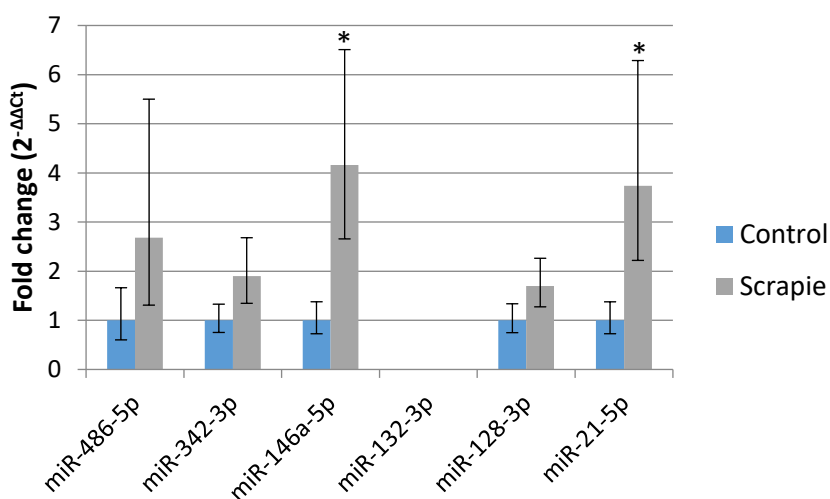


Figura 8. Expresión relativa de miRNAs en LCR sin la fracción exosomal de ovino sano y con scrapie. Las barras grises muestran la cantidad relativa de cada miRNA, calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a partir de datos obtenidos por RT-qPCR, en muestras de LCR (sin la fracción exosomal) de ovejas con scrapie, respecto a la cantidad detectada en ovejas control sanas (azul). Las barras de error representan el error estándar ($n=6$). Significación estadística respecto al control: t de Student (* $P<0.05$).

Los elevados errores estándar obtenidos en estos análisis (Figuras 6, 7 y 8) se deben además de al error metodológico, al bajo número de muestras de las que se disponía para el

estudio y a las diferencias intrínsecas entre los distintos animales. Las ovejas son animales grandes con un fondo genético muy variado por lo que distintos individuos, aunque sean de la misma raza y rebaño, pueden presentar importantes diferencias genéticas. Además, se utilizaron muestras procedentes de ovejas con distintas edades, lo que también puede aportar variabilidad. El grupo “scrapie” son muestras procedentes de ovejas con sintomatología clínica de scrapie, pero estos animales podían tener distintos grados de lesión en función de la cepa priónica y del avance de la enfermedad, lo que aportaría más variabilidad y explicaría el aumento de los errores estándar frente a los del grupo “control”.

En global, los análisis realizados confirman *in vivo* la alteración de 3 de los miRNAs propuestos como biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas en otros estudios (miR-486-5p, miR-146a-5p y miR-21-5p). Sin embargo, aunque en algunos modelos celulares parecía una ventaja aislar exosomas, los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que sería más conveniente realizar el diagnóstico con LCR dado el bajo nivel de miRNAs detectado en la fracción exosomal. Además, en el trabajo realizado en el grupo con plasma se obtuvieron resultados similares (Sanz-Rubio 2015). Esto parece indicar que la mayor parte de los miRNAs analizados circulan en ambos fluidos en asociación a complejos proteicos (Arroyo et al. 2011), y no incluidos en exosomas.

Recientemente se ha publicado un artículo en el que se comparó la expresión de una batería de miRNAs en LCR de pacientes con Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica y pacientes sanos (Llorens et al. 2018). Se obtuvieron diferencias significativas para uno de ellos, el miRNA-204-5p, que por lo tanto podría funcionar como biomarcador para el diagnóstico de la enfermedad.

Aunque el diagnóstico de scrapie en ovino no es factible utilizando biomarcadores de LCR, este estudio demuestra por primera vez la alteración de los miRNAs miR-486-5p, miR-146a-5p y miR-21-5p en LCR de un modelo natural de la enfermedad priónica, y los convierte en potenciales biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades priónicas humanas.

4.3 Evaluación de MSCs ovinas como modelo *in vitro* de EETs

Uno de los objetivos del presente trabajo consistía en implementar un modelo celular que permitiese estudiar las EETs en células procedentes de un hospedador natural de la enfermedad, concretamente, la especie ovina. Para ello se decidió cultivar células madre mesenquimales de 3 ovejas con distintos genotipos para el gen *PNRP* altamente susceptibles a la infección por

priones (ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ). A los cultivos se les denominó AA, VV y AV respectivamente.

Una vez establecidos los distintos cultivos, se evaluó su capacidad para proliferar, diferenciarse y replicar los priones.

4.3.1 Caracterización de las MSCs

4.3.1.1 Diferenciación neurogénica

Las MSCs ovinas se cultivaron con el medio comercial *PSC neural induction medium* (Gibco), utilizado para la diferenciación de células madre pluripotentes hacia células madre neurales. Para evaluar la diferenciación, además de observar al microscopio posibles cambios morfológicos, se analizó la expresión del gen que codifica para OCT4, un factor de transcripción asociado a la pluripotencia de las células madre.

La morfología de las células varió sutilmente. Como se puede observar en las imágenes las células sometidas a condiciones de diferenciación neurogénica adquirieron una forma más alargada (Figura 9).

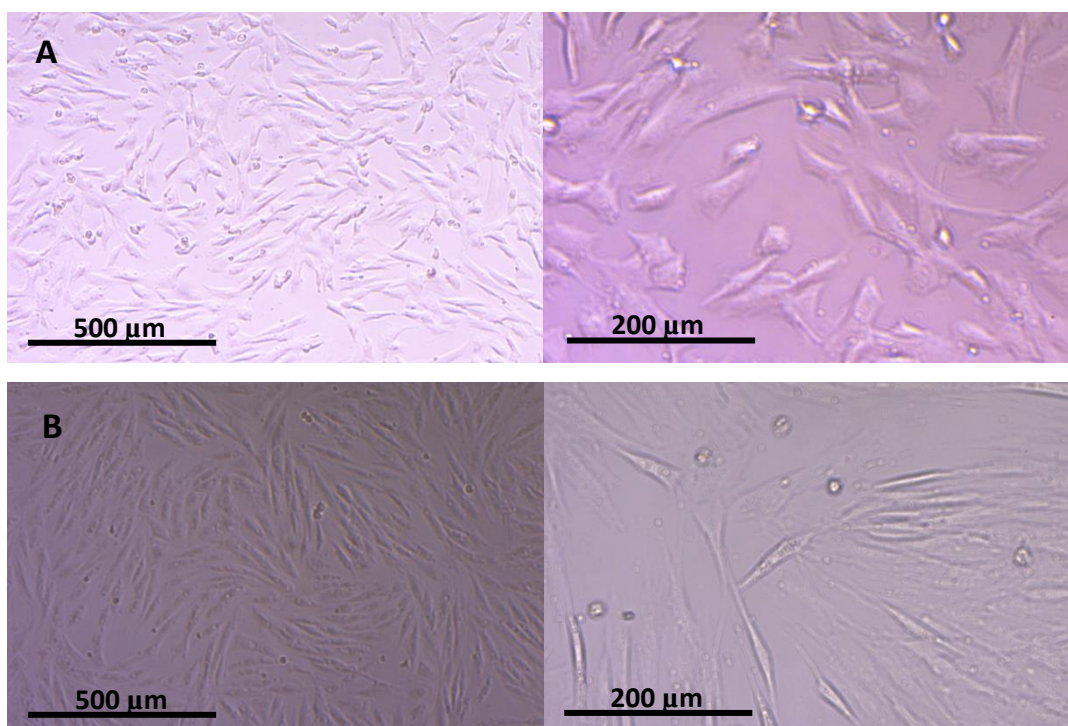


Figura 9. MSCs ovinas en condiciones de crecimiento estándar (A) y sometidas a diferenciación neurogénica (B).

La expresión del gen que codifica el factor de transcripción OCT4 se vio reducida en los 3 cultivos al mantener las células en condiciones de diferenciación neurogénica. De hecho, no se pudo realizar estadística porque, aunque sí pudo detectarse correctamente en la mayoría de las

muestras en condiciones estándar de crecimiento, se encontraba por debajo de límite de detección en la mayoría de las muestras sometidas a diferenciación neurogénica. Dado que el factor de transcripción OCT4 desempeña un papel en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre (Pan et al. 2002; Shi and Jin 2010), estos resultados parecen indicar que las células sometidas a condiciones de diferenciación neurogénica han perdido pluripotencia y que por lo tanto, han comenzado un proceso de diferenciación hacia células del SNC.

4.3.1.2 Expresión de genes asociados a la replicación priónica

Como se ha comentado previamente, algunos polimorfismos en el gen que codifica para la PrP afectan a los tiempos de incubación y la susceptibilidad a la enfermedad priónica. Sin embargo, se ha visto que ratones con el mismo genotipo para el gen *PRNP* presentan diferencias significativas en estos aspectos, revelando una importante influencia de otros factores genéticos (Carlson et al. 1993; Lloyd et al. 2001).

Analizando las diferencias de expresión génica entre líneas celulares susceptibles y resistentes a la infección por priones se identificó un conjunto de genes asociados a la replicación priónica (Marbiah et al. 2014). Cabe destacar que gran parte de estos genes participan en la diferenciación celular.

En el presente trabajo se decidió comparar por qPCR la expresión de algunos de los genes identificados por Marbiah y colaboradores en 2014 (*FN1*, *PAPSS2*, *ITG α 8*, *CHGA* Y *BAMBI*) en cultivos de MSCs en condiciones estándar de crecimiento (C) frente a su expresión en las mismas células sometidas a diferenciación neurogénica (N).

Los resultados obtenidos quedan representados en la Figura 10. Como se puede observar en dicha figura, el gen *FN1* disminuyó significativamente al someter las células a diferenciación neurogénica en los tres cultivos analizados (AA, AV y VV). Los genes *PAPSS2* e *ITG α 8* parecían sufrir el mismo efecto pero, para el primero de ellos no se obtuvieron diferencias significativas en el cultivo VV y la expresión del segundo no se pudo analizar estadísticamente en los cultivos AV y VV, pues sí se pudo cuantificar en los cultivos control pero su nivel en los cultivos sometidos a diferenciación neurogénica estaba por debajo del límite de detección. El gen *BAMBI* también desciende significativamente en el cultivo AA, sin embargo el efecto del proceso de diferenciación sobre este gen en los cultivos AV y VV es menos claro, probablemente debido a que las señales detectadas fueron muy débiles (valores de Ct elevados) y por lo tanto la variabilidad mayor. La expresión relativa del gen *CHGA* no se pudo analizar en ninguno de los cultivos ya que se encontraba por debajo del límite de detección en ambos grupos.

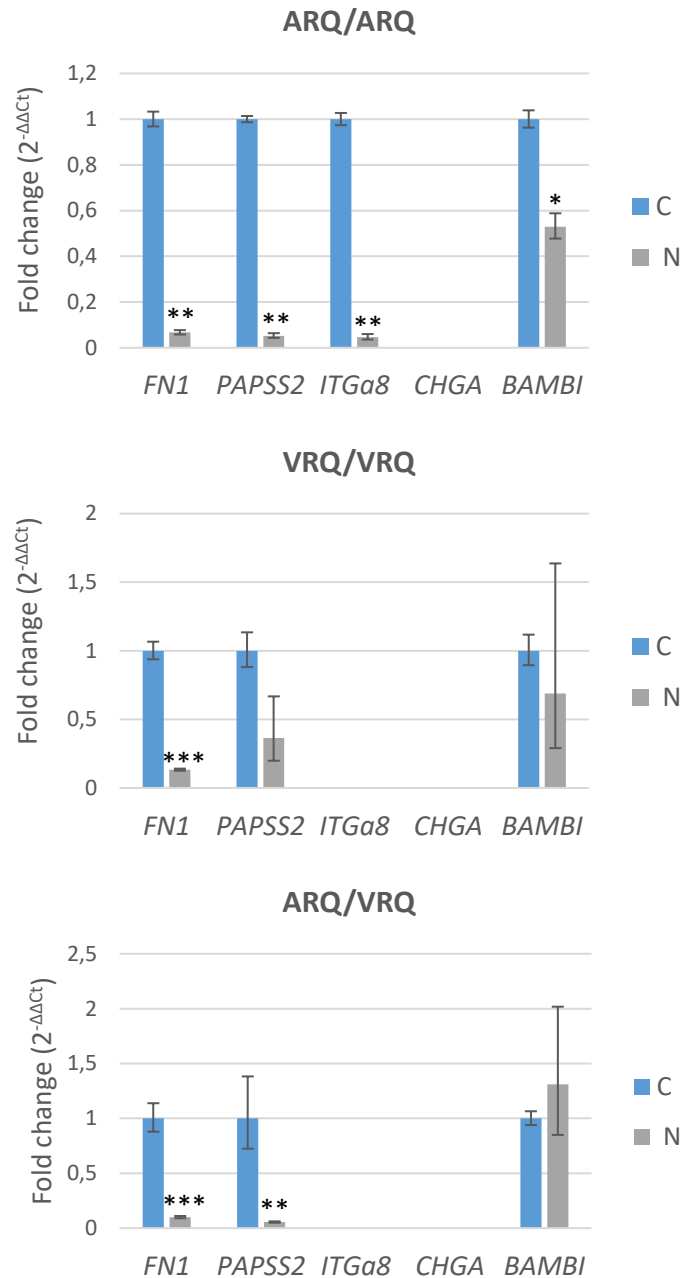


Figura 10. Expresión relativa de genes asociados a la replicación priónica en células mesenquimales procedentes de ovejas con genotipo ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ. Las barras grises muestran la cantidad relativa de cada gen, calculada por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a partir de datos obtenidos por RT-qPCR, en muestras de cultivo de células mesenquimales ovinas sometidas a diferenciación neurogénica (N), respecto a la cantidad detectada en muestras de cultivo de células mesenquimales control (C, azul). Las barras de error representan el error estándar (n=3). Significación estadística respecto al control: t de Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Marbiah y colaboradores derivaron por subclonación una línea celular altamente susceptible a los priones y, a partir de estas células, aislaron clones que mostraban velocidades de propagación de priones marcadamente reducidas, a los que denominaron clones revertidos resistentes (RR) (Marbiah et al. 2014). Se observó que los genes analizados en el presente trabajo *FN1*, *PAPSS2*, *ITGa8*, *CHGA* y *BAMBI* se veían asociados con la susceptibilidad a la

infección priónica de tal forma que su expresión era menor en las células susceptibles que en las resistentes, e incluso que el silenciamiento génico único de los cuatro primeros recapitulaba en las células RR la transición de un fenotipo resistente a uno susceptible. En general, los resultados obtenidos en nuestros análisis parecen indicar que los niveles de la mayoría de los genes analizados descienden en las MSCs cuando son sometidas a un proceso de diferenciación neurogénica, sobre todo en el cultivo AA. Esto parece indicar que el proceso de diferenciación neurogénica al que se ha sometido los cultivos de MSCs podría facilitar la replicación priónica.

Además este resultado es consistente con otra de las observaciones realizada por estos autores, que la preincubación con un agente de diferenciación aumentaba la tasa de replicación de priones en las células RR convirtiéndolas en células susceptibles. Todo esto sugiere que los procesos celulares asociados con el estado de diferenciación de las células modulan la susceptibilidad a la propagación de los priones.

4.3.1.3 Proliferación celular

Con el objetivo de analizar posibles diferencias entre la proliferación celular de los distintos cultivos de MSCs (AA, VV y AV) bajo condiciones de crecimiento estándar se realizó un ensayo MTT. Se obtuvieron diferencias significativas entre los ratios de proliferación de los distintos cultivos, siendo el cultivo AA el de menor proliferación y el AV el de mayor (Figura 11).

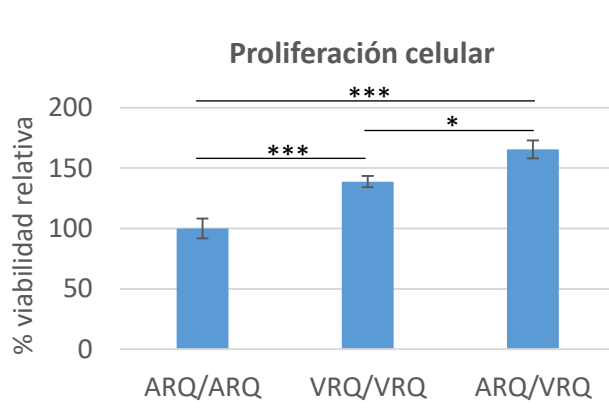


Figura 11. Proliferación celular en cultivos de MSCs procedentes de ovejas con genotipo ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ. Los porcentajes de viabilidad relativa fueron calculados suponiendo que la viabilidad del cultivo de menor proliferación era del 100%. Las barras de error representan el error estándar ($n=8$). Significación estadística: *t* de Student (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

En diferentes trabajos se ha observado que hay una alta variabilidad entre cultivos de MSCs ovinas en función del donante (Lyahyai et al. 2012; Mediano et al. 2015; Rhodes et al. 2004), por tanto, no podemos asumir que las diferencias en la tasa de proliferación observadas se deban al genotipo. Para poder confirmarlo sería necesario repetir este ensayo con más cultivos de MSCs procedentes de otros individuos con los mismos genotipos.

4.3.2 Inoculación de MSCs con extractos de cerebro ovino

4.3.2.1 Replicación de los priones por las MSCs

Con el objetivo de estudiar la capacidad de los distintos cultivos de MSCs para multiplicar el prión, se infectaron con inóculo cerebral de ovino con scrapie y se determinó mediante un ELISA la cantidad de PrP^{Sc} en los cultivos a distintos tiempos tras la infección (T1, T2 y T3; 2, 4 y 7 días, respectivamente).

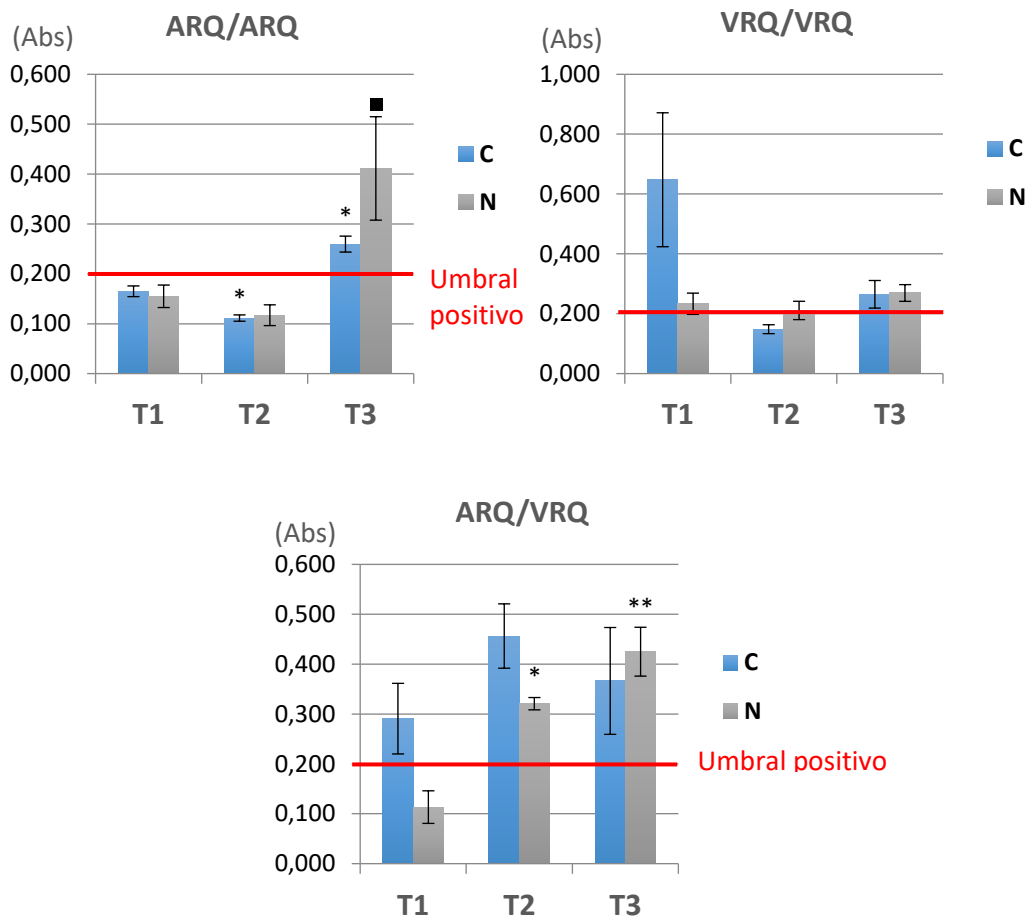


Figura 12. Evolución de los niveles de PrP^{Sc} en cultivos de células mesenquimales ovinas tras su infección con inóculo cerebral de ovino con scrapie. La altura de las barras es proporcional a la cantidad de PrP^{Sc} en los cultivos sometidos a condiciones de crecimiento estándar (C) y en diferenciación neurogénica (N) a distintos tiempos tras la infección (T1, T2 y T3; 2, 4 y 7 días, respectivamente). Las barras de error representan el error estándar (n=3). Significación estadística respecto a T1: t de Student (*P<0.1 tendencia, * P<0.05, ** P<0.01).

En el caso de los cultivos en condiciones estándar de crecimiento (C) solo se obtuvieron diferencias significativas entre la cantidad de PrP^{Sc} detectada a los distintos tiempos en el cultivo procedente de la oveja con genotipo ARQ/ARQ (Figura 12). A T2 la PrP^{Sc} disminuye respecto a T1, probablemente debido a los lavados realizados. Sin embargo a T3 la PrP^{Sc} aumenta significativamente, lo que parece indicar que las células AA sin diferenciar son capaces de multiplicar el prión. En cuanto a las células sometidas a diferenciación neurogénica, se observó

un aumento significativo de la PrP^{Sc} con el tiempo en los cultivos AA y AV. Esto sugiere que ambos son capaces de replicar el príon en condiciones de diferenciación. Sin embargo, en las células procedentes de la oveja con genotipo VRQ/VRQ, descrito como el alelo más relacionado con la susceptibilidad al scrapie (Badiola and Pumarola 2010), no se observaron cambios significativos en ninguna de las condiciones.

Este resultado, en principio puede resultar sorprendente, sin embargo es consistente con los resultados obtenidos por qPCR en el análisis de genes asociados con la replicación priónica. Pues en el cultivo celular con genotipo ARQ/ARQ se obtuvieron diferencias significativas para la disminución de todos los genes analizados, mientras que en los otros dos cultivos, procedentes de ovejas con genotipos ARQ/VRQ y VRQ/VRQ, solo se obtuvieron diferencias significativas para la disminución de *FN1* y *PAPSS2* y *FN1*, respectivamente (Figura 10).

En un estudio con células madre pluripotentes inducidas humanas diferenciadas a astrocito e inoculadas con priones se determinó que las células en división no eran capaces de llevar a cabo la replicación priónica (Krejciova et al. 2017), por lo que además de la influencia del genotipo, la menor proliferación observada en el cultivo AA (apartado 4.3.1.3) podría haber facilitado la multiplicación del príon.

Por otro lado, aunque la señal descendió en T2, el cultivo VV es el que presentó una señal más intensa de PrP^{Sc} en T1 (Figura 12). Esto podría relacionarse con una gran capacidad de captar PrP^{Sc} de este cultivo y la disminución observada podría ser causada por la toxicidad de la proteína patológica.

4.3.2.2 Expresión de genes asociados a la replicación priónica tras la infección

Con el objetivo de analizar en qué medida la inoculación con el extracto cerebral positivo podía haber afectado los niveles de expresión de los genes asociados a la replicación priónica previamente analizados (*FN1*, *PAPSS2*, *ITGA8*, *CHGA* y *BAMBI*), se realizaron los mismos ensayos 7 días tras la inoculación (T3).

La expresión relativa del gen *CHGA* no se pudo analizar en ninguno de los cultivos ya que se encontraba por debajo del límite de detección en ambos grupos.

Los resultados obtenidos para los genes *ITGA8* y *BAMBI* (Figura 13) fueron similares a los obtenidos en los cultivos sin inocular (apartado 4.3.1.2). La expresión de *ITGA8* es menor en las células sometidas a condiciones de diferenciación neurogénica (N) que en las sometidas a condiciones estándar de crecimiento, pues en dos cultivos no se pudo cuantificar en las muestras N pero si en las C y en el otro se obtuvieron diferencias significativas. La expresión de *BAMBI*

sufre el mismo efecto en el cultivo AA, habiendo diferencias significativas entre ambas condiciones, pero en los otros dos cultivos no se obtuvieron diferencias significativas.

La expresión relativa del gen *CHGA* no se pudo analizar en ninguno de los cultivos ya que se encontraba por debajo del límite de detección en ambos grupos.

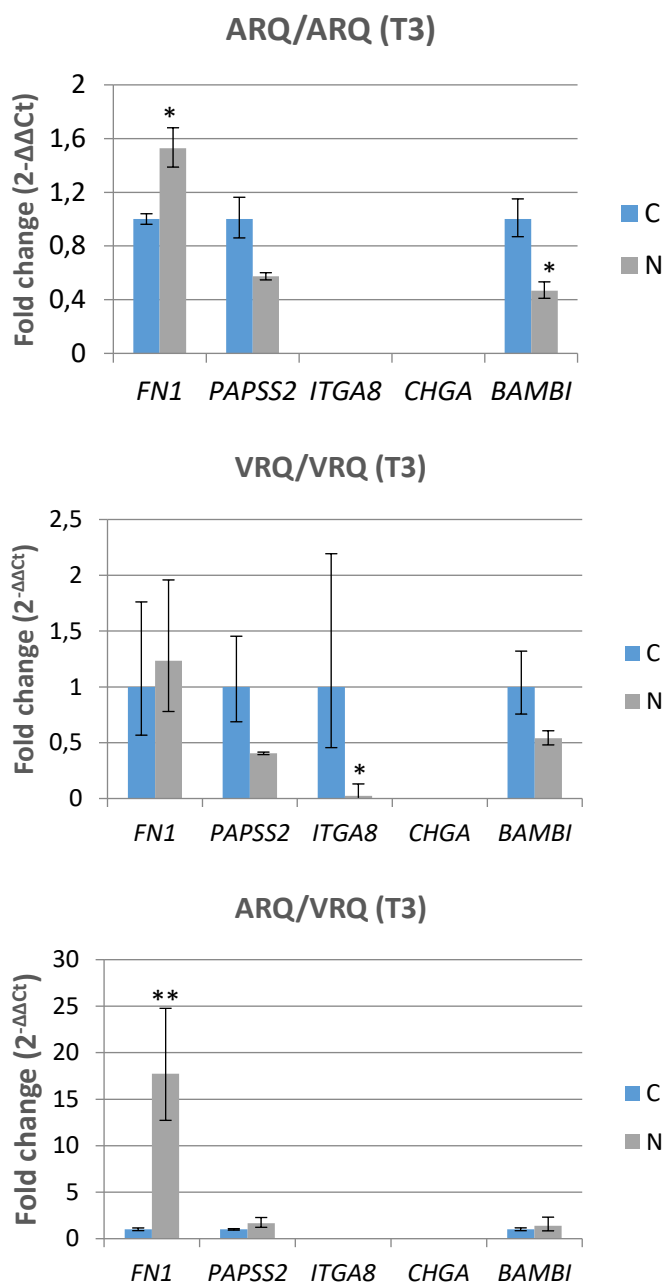


Figura 13. Expresión relativa de genes asociados a la replicación priónica en células mesenquimales procedentes de ovejas con genotipo ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ 7 días tras su inoculación con extracto cerebral de ovino con scrapie al 1% (T3). Las barras grises muestran la cantidad relativa de cada gen, calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a partir de datos obtenidos por RT-qPCR, en muestras de cultivo de células mesenquimales ovinas sometidas a diferenciación neurogénica (N), respecto a la cantidad detectada en muestras de cultivo de células mesenquimales control (C, azul). Las barras de error representan el error estándar ($n=3$). Significación estadística respecto al control: *t* de Student (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Los resultados obtenidos para los genes *FN1* y *PAPSS2* (Figura 13) fueron, sin embargo, notablemente diferentes a los obtenidos en los cultivos sin inocular (apartado 4.3.1.2). Los niveles de expresión del gen *PAPSS2* en los distintos cultivos son similares en las MSCs control (C) y en las sometidas a condiciones de diferenciación neurogénica (N) pues no se obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los cultivos. Sin embargo, en los cultivos AA y AV sin inocular la expresión de *PAPSS2* era significativamente menor en las células N (Figura 10). En el caso de *FN1* sí que se observan diferencias significativas en dos de los cultivos inoculados, pero curiosamente hay un mayor nivel de expresión en las células sometidas a diferenciación mientras que en las células sin inocular se observaba el efecto contrario.

Creemos que este cambio de los perfiles de expresión no se debe tanto a un aumento en las células N debido a la inoculación sino a una disminución de los niveles en las células C como consecuencia de la infección. Esto sugiere que la infección priónica podría ser capaz de modular la expresión de algunos genes para favorecer la replicación de los priones. Para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar nuevos análisis comparando los cultivos antes y después de la inoculación.

4.3.2.3 Efecto del tejido cerebral sobre la proliferación celular de las MSCs

Con el objetivo de analizar si el tejido cerebral de ovejas tanto sanas como con sintomatología de scrapie podría tener un efecto sobre la proliferación celular de las MSCs, se inocularon las células con extracto cerebral negativo (I-) y positivo (I+) y se realizó un ensayo MTT.

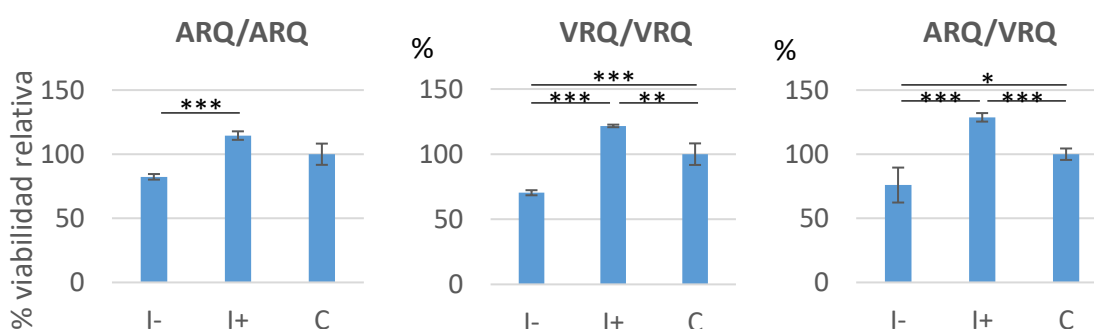


Figura 14. Efecto de la inoculación de extracto cerebral sobre la proliferación celular en cultivos de MSCs procedentes de ovejas con genotipo ARQ/ARQ, VRQ/VRQ y ARQ/VRQ. Las células se inocularon con extracto cerebral de ovejas con scrapie (I+) o sanas (I-). Las células control (C) no fueron inoculadas. Los porcentajes de viabilidad relativa fueron calculados suponiendo que la viabilidad del control era del 100%. Las barras de error representan el error estándar (n=8). Significación estadística: t de Student (* P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001).

La inoculación de las células con extracto cerebral de ovejas sanas al 1% produjo una disminución en el ratio de proliferación, observándose diferencias significativas respecto a las

células control en las células VV y AV (Figura 14). Sin embargo, al inocular las células con extracto cerebral de ovejas con scrapie se produjo un aumento en la tasa de proliferación celular.

Como se ha comentado en la introducción, se ha descrito *in vivo* que las MSCs son capaces de migrar hasta los tejidos dañados por quimiotaxis en distintas enfermedades incluyendo la enfermedad priónica (Song et al. 2009). Este efecto también se ha observado *in vitro* e incluso se han identificado los factores quimioattractivos responsables de la migración de las MSCs a las lesiones cerebrales causadas por priones (Song et al. 2011). En este ensayo hemos observado que los extractos cerebrales de ovejas con scrapie promueven la proliferación de las MSCs *in vitro*, por lo que probablemente los tejidos cerebrales dañados secreten, además de factores quimioattractivos, factores capaces de producir este efecto, por ejemplo, factores de crecimiento.

En cuanto al descenso en el ratio de proliferación observado con el inóculo negativo es un resultado cuya causa se desconoce y habría que seguir investigando.

5. CONCLUSIONES

1. Los miRNAs miR-486-5p, miR-146a-5p, y miR-21-5p se encuentran alterados en LCR de ovino con scrapie, lo que los confirma como potenciales biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades priónicas.

2. El aislamiento de exosomas a partir de LCR no facilita el diagnóstico mediante detección de miRNAs desregulados dada su baja concentración.

3. Al someter las MSCs ovinas a diferenciación neurogénica disminuye la expresión de genes cuyo descenso está relacionado con la susceptibilidad a la enfermedad priónica.

4. Algunos cultivos de MSCs ovinas son capaces de replicar el prión incluso sin ser sometidos a diferenciación neurogénica. Serían necesarios estudios adicionales para comprobar si esta capacidad depende del genotipo, de la tasa de proliferación celular u otros factores.

5. La infección con scrapie modula la expresión de algunos genes en sus células huésped, lo que podría favorecer la replicación del prión.

6. Los tejidos cerebrales de ovino con scrapie promueven la proliferación de las MSCs *in vitro*.

7. Los resultados obtenidos muestran un gran potencial de las MSCs ovinas como modelos *in vitro* para el estudio de las enfermedades priónicas.

CONCLUSIONS

1. MicroRNAs miR-486-5p, miR-146a-5p, and miR-21-5p are altered in the cerebrospinal fluid (CSF) of sheep infected with scrapie, which confirms these as potential biomarkers for the diagnosis of prion diseases.

2. The isolation of exosomes from CSF does not facilitate the diagnosis by means of the detection of deregulated miRNAs due to their low concentration.

3. When ovine mesenchymal stem cells (MSC) are subjected to neurogenic differentiation, the genes whose decrease is related to susceptibility to the prion disease reduce their expression.

4. Some ovine MSC cultures are able to replicate the prion even without being subjected to neurogenic differentiation. Further research is necessary to test whether this depends on the genotype, the cellular proliferation rate or other factors.

5. Scrapie infection modulates the expression of some genes in its host cells, which could facilitate prion replication.

6. Ovine cerebral tissues infected with scrapie promote MSCs proliferation *in vitro*.

7. The obtained results indicate that sheep MSCs have a great potential as *in vitro* models for the studies of prion diseases.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguzzi, A., and F. L. Heppner. 2000. "Pathogenesis of Prion Diseases: A Progress Report." *Cell Death and Differentiation* 7(10): 889–902.
- Akimov, S. et al. 2008. "Persistent Propagation of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Agent in Murine Spleen Stromal Cell Culture with Features of Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Virology* 82(21): 10959–62.
- Akimov, S. et al. 2009. "Murine Bone Marrow Stromal Cell Culture with Features of Mesenchymal Stem Cells Susceptible to Mouse-Adapted Human TSE Agent, Fukuoka-1." *Folia Neuropathologica* 47(2): 205–14.
- Alais, S. et al. 2008. "Mouse Neuroblastoma Cells Release Prion Infectivity Associated with Exosomal Vesicles." *Biology of the Cell* 100(10): 603–18.
- Arellano-Anaya, Z. E. et al. 2014. "Prion Strains Are Differentially Released through the Exosomal Pathway." *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(6): 1185–96.
- Arroyo, J. D. et al. 2011. "Argonaute2 Complexes Carry a Population of Circulating MicroRNAs Independent of Vesicles in Human Plasma." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(12): 5003–8.
- Atkinson, C. J. et al. 2016. "Prion Protein Scrapie and the Normal Cellular Prion Protein." *Prion* 10(1): 63–82.
- Badiola, J. J., and M. Pumarola. 2010. *Encefalopatías Espongiformes Transmisibles*. Ediciones Mayo.
- Bard, M. P et al. 2004. "Proteomic Analysis of Exosomes Isolated from Human Malignant Pleural Effusions." *American Journal of respiratory cell and molecular biology* 31(1): 114–21.
- Barria, M. A., D. Gonzalez-romero, and C. Soto. 2012. "Cyclic Amplification of Prion Protein Misfolding." *Methods Mol Biol* 849: 199–212.
- Basso, M., and V. Bonetto. 2016. "Extracellular Vesicles and a Novel Form of Communication in the Brain." *Frontiers in Neuroscience* 10(127): 1–13.
- Bellingham, S. A., B. M. Coleman, and A. F. Hill. 2012. "Small RNA Deep Sequencing Reveals a Distinct MiRNA Signature Released in Exosomes from Prion-Infected Neuronal Cells." *Nucleic Acids Research* 40(21): 10937–49.
- Berrone, E. et al. 2015. "Detection of Cellular Prion Protein in Exosomes Derived from Ovine Plasma." *Journal of General Virology* 96(12): 3698–3702.
- Büeler, H. et al. 1994. "High Prion and PrPsc Levels but Delayed Onset of Disease in Scrapie-Inoculated Mice Heterozygous for a Disrupted PrP Gene." *Molecular medicine* 1(1): 19–30.
- Carlson, G. A. et al. 1993. "Delimiting the Location of the Scrapie Prion Incubation Time Gene on Chromosome 2 of the Mouse." *Genetics Society of America* 133(4): 979–88.
- Cassard, H. et al. 2014. "Evidence for Zoonotic Potential of Ovine Scrapie Prions." *Nature Communications* 5(5821): 1–9.
- Cervenakova, L. et al. 2011. "Fukuoka-1 Strain of Transmissible Spongiform Encephalopathy Agent Infects Murine Bone Marrow-Derived Cells with Features of Mesenchymal Stem Cells." *Transfusion* 51(8): 1755–68.
- Chen, J., and M. Chopp. 2006. "Neurorestorative Treatment of Stroke: Cell and Pharmacological Approaches." *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 3(4): 466–473.
- Cheng, L., W. Zhao, and A. F. Hill. 2018. "Exosomes and Their Role in the Intercellular Trafficking of Normal and Disease Associated Prion Proteins." *Molecular Aspects of Medicine* 60: 62–68.
- Coleman, B. M., E. Hanssen, V. A. Lawson, and A. F. Hill. 2012. "Prion-Infected Cells Regulate the Release of Exosomes with Distinct Ultrastructural Features." *The FASEB Journal* 26(10): 4160–73.
- Comoy, E. E. et al. 2015. "Transmission of Scrapie Prions to Primate after an Extended Silent

- Incubation Period." *Scientific Reports* 5: 11573–83.
- Curcio, L. et al. 2016. "A Review on Classical and Atypical Scrapie in Caprine: Prion Protein Gene Polymorphisms and Their Role in the Disease." *Animal* 10(10): 1585–93.
- Dasari, V. R., K. K. Veeravalli, and D. H. Dinh. 2014. "Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Spinal Cord Injuries: A Review." *World Journal of Stem Cells* 6(2): 120–33.
- Deleault, N. R., R. W. Lucassen, and S. Supattapone. 2003. "RNA Molecules Stimulate Prion Protein Conversion." *Nature* 425(6959): 717–20.
- Detwiler, L. A. 1992. "Scrapie." *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 11(2): 491–537.
- Detwiler, L. A., and M. Baylis. 2003. "The Epidemiology of Scrapie." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 22(1): 121–43.
- Ding, D., W. Shyu, and S. Lin. 2011. "Mesenchymal Stem Cells." *Cell Transplantation* 20(1): 5–14.
- Edgar, J. R. 2016. "Q & A: What Are Exosomes, Exactly?" *BMC Biology* 14(46): 1–7.
- EFSA panel on Biological Hazards. 2015. "Scientific Opinion on a Request for a Review of a Scientific Publication Concerning the Zoonotic Potential of Ovine Scrapie Prions." *EFSA Journal* 13(8): 4197–4255.
- Fehlinger, A. et al. 2017. "Prion Strains Depend on Different Endocytic Routes for Productive Infection." *Scientific Reports* 7(6923): 1–15.
- Fevrier, B. et al. 2004. "Cells Release Prions in Association with Exosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(26): 9683–88.
- Geschwind, M. D. 2015. "Prion Diseases." *Continuum* 21(6): 1612–38.
- Gimble, J. M. et al. 2008. "In Vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells." *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 35(3): 228–38.
- Gousset, K. et al. 2009. "Prions Hijack Tunnelling Nanotubes for Intercellular Spread." *Nature Cell Biology* 11(3): 328–36.
- Gugliandolo, A., P. Bramanti, and E. Mazzon. 2017. "Mesenchymal Stem Cell Therapy in Parkinson's Disease Animal Models." *Current Research in Translational Medicine* 65(2): 51–60.
- Guo, B. B., S. A. Bellingham, and A. F. Hill. 2015. "The Neutral Sphingomyelinase Pathway Regulates Packaging of the Prion Protein into Exosomes." *The Journal of Biological Chemistry* 290(6): 3455–67.
- Guo, B. B., Shayne A. Bellingham, and Andrew F. Hill. 2016. "Stimulating the Release of Exosomes Increases the Intercellular Transfer of Prions." *The journal of biological chemistry* 291(10): 5128–37.
- Harding, C., J. Heuser, and P. Stahl. 1983. "Receptor-Mediated Endocytosis of Transferrin and Recycling of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes." *The Journal of cell biology* 97(2): 329–39.
- Hasan, A. et al. 2017. "Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury." *Frontiers in Neurology* 8(28): 1–15.
- Imran, M., and M. Saqib. 2011. "An Overview of Human Prion Diseases." *Virology journal* 8(559): 1–9.
- Isola, A. L., and S. Chen. 2017. "Exosomes: The Messengers of Health and Disease." *Current Neuropharmacology* 15(1): 157–65.
- Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, and C. Turbide. 1987. "Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation." *The journal of biological chemistry* 262(19): 9412–20.
- Jung, M. K., and J.Y. Mun. 2018. "Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy." *JOVE* (131): 1–5.
- Kalani, A. et al. 2017. "Dementia-like Pathology in Type-2 Diabetes: A Novel MicroRNA Mechanism." *Molecular and Cellular Neuroscience* 80: 58–65.
- Kalani, A., A. Tyagi, and N. Tyagi. 2014. "Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics." *Mol Neurobiol* 49(1): 590–600.
- Kanu, N. et al. 2002. "Transfer of Scrapie Prion Infectivity by Cell Contact in Culture." *Current Biology* 12(7): 523–30.

- Kapsogeorgou, E. K., R. F. Abu-helu, H. M. Moutsopoulos, and M. N. Manoussakis. 2005. "Salivary Gland Epithelial Cell Exosomes, A Source of Autoantigenic Ribonucleoproteins." *Arthritis & Rheumatism* 52(5): 1517–21.
- Kesimer, M. et al. 2009. "Characterization of Exosome-like Vesicles Released from Human Tracheobronchial Ciliated Epithelium: A Possible Role in Innate Defense." *The FASEB Journal* 23(6): 1858–68.
- Krejciova, Z. et al. 2017. "Human Stem Cell-derived Astrocytes Replicate Human Prions in a PRNP Genotype-dependent Manner." *The Journal of Experimental Medicine* 214(12): 3481–95.
- Kuhn, O. 2015. "Science Break: Prions." *CSEG Recorder* 40(1): 1–9.
- Lässer, C., M. Eldh, and J. Lötvall. 2012. "Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes." *JOVE* (59): 1–6.
- Lewis, C. M., and M. Suzuki. 2014. "Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Stem Cell Research & Therapy* 5(32): 1–10.
- Li, P. et al. 2017. "Progress in Exosome Isolation Techniques." *Theranostics* 7(3): 789–804.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25(4): 402–8.
- Llorens, F. et al. 2018. "Regional and Subtype-Dependent MiRNA Signatures in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Are Accompanied by Alterations in MiRNA Silencing Machinery and Biogenesis." *PLoS Pathogens* 14(1): 1–33.
- Lloyd, S. E. et al. 2001. "Identification of Multiple Quantitative Trait Loci Linked to Prion Disease Incubation Period in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(11): 6279–83.
- Lötvall, J. et al. 2014. "Minimal Experimental Requirements for Definition of Extracellular Vesicles and Their Functions: A Position Statement from the International Society for Extracellular Vesicles." *Journal of Extracellular Vesicles* 3(1): 26913–18.
- Lungu, G., G. Stoica, and A. Ambrus. 2013. "MicroRNA Profiling and the Role of MicroRNA-132 in Neurodegeneration Using a Rat Model." *Neuroscience Letters* 553: 153–58.
- Lyahyai, J. et al. 2012. "Isolation and Characterization of Ovine Mesenchymal Stem Cells Derived from Peripheral Blood." *BMC Veterinary Research* 8(169): 1–10.
- Marbiah, M. M. et al. 2014. "Identification of a Gene Regulatory Network Associated with Prion Replication." *The EMBO Journal* 33(14): 1527–47.
- Mareschi, K. et al. 2006. "Neural Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: Evidence for Expression of Neural Markers and Eag K⁺ Channel Types." *Experimental Hematology* 34(11): 1563–72.
- McGough, I. J., and J. Vincent. 2016. "Exosomes in Developmental Signalling." *Development* 143(14): 2482–93.
- Mediano, D. R. et al. 2014. "The Potential of Mesenchymal Stem Cell in Prion Research." *Zoonoses and Public Health* 62(3): 165–78.
- Mediano, D. R. et al. 2015. "Characterization of Mesenchymal Stem Cells in Sheep Naturally Infected with Scrapie." *Journal of General Virology* 96(12): 3715–26.
- Mendivil-García, L. 2016. "Evaluación de La Toxicidad Inducida Por Priones En Cultivos de Células Mesenquimales Ovinas." Universidad de Zaragoza.
- Moum, T. et al. 2005. "Polymorphisms at Codons 141 and 154 in the Ovine Prion Protein Gene Are Associated with Scrapie Nor98 Cases." *Journal of General Virology* 86(1): 231–35.
- Nagaraj, S. et al. 2017. "Profile of 6 MicroRNA in Blood Plasma Distinguish Early Stage Alzheimer's Disease Patients from Non-Demented Subjects." *Oncotarget* 8(10): 16122–43.
- Nazimek, K., K. Bryniarski, M. Santocki, and W. Ptak. 2015. "Exosomes as Mediators of Intercellular Communication: Clinical Implications." *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej* 125(5): 370–80.
- O'Rourke, K. I. et al. 2000. "Preclinical Diagnosis of Scrapie by Immunohistochemistry of Third Eyelid Lymphoid Tissue." *Journal of Clinical Microbiology* 38(9): 3254–59.
- O'Rourke, K. I., T. V. Baszler, S. M. Parish, and D. P. Knowles. 1998. "Preclinical Detection of PrPSc

- in Nictitating Membrane Lymphoid Tissue of Sheep." *The Veterinary record* 142(18): 489–91.
- Pan, G. J., Z.Y. Chang, H. R. Scher, and D. Pei. 2002. "Stem Cell Pluripotency and Transcription Factor Oct4." *Cell Research* 12(5–6): 321–29.
- Phinney, D.G., and I. Isakova. 2005. "Plasticity and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Nervous System." *Current Pharmaceutical Design* 11(10): 1255–65.
- Pittenger, M. F. et al. 1999. "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." *Science* 284(5411): 143–47.
- Prusiner, S. B. 1995. "The Prion Diseases." *Scientific American* 272(1): 48–51, 54–57.
- Qi, K., N. Li, Z. Zhang, and G. Melino. 2017. "Tissue Regeneration: The Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Immune Response." *Cellular Immunology* 326: 86–93.
- Rhodes, N. P., J. K. Srivastava, R. F. Smith, and C. Longinotti. 2004. "Heterogeneity in Proliferative Potential of Ovine Mesenchymal Stem Cell Colonies." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 15(4): 397–402.
- Ritchie, A. J. et al. 2013. "Normal Prion Protein Is Expressed on Exosomes Isolated from Human Plasma." *British Journal of Haematology* 163(5): 678–80.
- Saá, P. et al. 2014. "First Demonstration of Transmissible Spongiform Encephalopathy-Associated Prion Protein (PrPTSE) in Extracellular Vesicles from Plasma of Mice Infected with Mouse-Adapted Variant Creutzfeldt-Jakob Disease by in Vitro Amplification." *Journal of Biological Chemistry* 289(42): 29247–60.
- Saba, R. et al. 2008. "A MiRNA Signature of Prion Induced Neurodegeneration." *PLoS ONE* 3(11): 1–11.
- Saba, R. et al. 2012. "MicroRNA 146a (MiR-146a) Is over-Expressed during Prion Disease and Modulates the Innate Immune Response and the Microglial Activation State." *PLoS ONE* 7(2): 1–16.
- Saborio, G. P., B. Permanne, and C. Soto. 2001. "Sensitive Detection of Pathological Prion Protein by Cyclic Amplification of Protein Misfolding." *Nature* 411(6839): 810–13.
- Sanz-Rubio, D. 2015. "Análisis de MicroRNAs En Plasma Circulante, Exosomas Circulantes y Sistema Nervioso Central de Ovino Con Scrapie." Universidad de Zaragoza.
- Sanz-Rubio, D. et al. 2017. "Increased Circulating MicroRNAs MiR-342-3p and MiR-21-5p in Natural Sheep Prion Disease." *Journal of General Virology* 98(2): 305–10.
- Sardar-Sinha, M. et al. 2018. "Alzheimer's Disease Pathology Propagation by Exosomes Containing Toxic Amyloid-Beta Oligomers." *Acta Neuropathologica* 136(1): 41–56.
- Shi, G., and Y. Jin. 2010. "Role of Oct4 in Maintaining and Regaining Stem Cell Pluripotency." *Stem Cell Research and Therapy* 1(5): 39–47.
- da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi. 2006. "Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues." *Journal of Cell Science* 119(11): 2204–13.
- Song, C.-H. et al. 2009. "Effect of Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Mice Infected with Prions." *Journal of Virology* 83(11): 5918–27.
- 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." *Journal of Virology* 85(21): 11069–78.
- Soto, C., P. Gabriela, and L. Anderes. 2002. "Cyclic Amplification of Protein Misfolding: Application to Prion-Related Disorders and Beyond." *Trends in Neurosciences* 25(8): 390–94.
- Stetefeld, J., S. A. McKenna, and T. R. Patel. 2016. "Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences." *Biophysical Reviews* 8(4): 409–27.
- Street, J. M. et al. 2012. "Identification and Proteomic Profiling of Exosomes in Human Cerebrospinal Fluid." *Journal of Translational Medicine* 10(1): 5–11.
- Takada, L., and M. D. Geschwind. 2013. "Prion Diseases." *Semin Neurol* 33(4): 348–56.
- Takemura, K. et al. 2004. "An Overview of Transmissible Spongiform Encephalopathies." *Animal Health Research Reviews* 5(2): 103–24.

- Théry, C., S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton. 2006. "Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids." In *Current Protocols in Cell Biology*, , Chapter 3. Unit 3.22.
- Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. "Exosomes: Composition, Biogenesis and Function." *Immunology* 2(8): 569–79.
- Trajkovic, K. et al. 2008. "Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes." *Science* 319(5867): 1244–47.
- Uchiyama, K. et al. 2017. "Prions Amplify through Degradation of the VPS10P Sorting Receptor Sortilin." *PLoS Pathogens* 13(6): 1–30.
- Vella, L. J. et al. 2007. "Packaging of Prions into Exosomes Is Associated with a Novel Pathway of PrP Processing." *Journal of Pathology* 211(5): 582–90.
- Vella, L. J. et al. 2008. "Enrichment of Prion Protein in Exosomes Derived from Ovine Cerebral Spinal Fluid." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 124(3–4): 385–93.
- Waldenström, A., and G. Ronquist. 2014. "Role of Exosomes in Myocardial Remodeling." *Circulation Research* 114(2): 315–24.
- Welton, J. L. et al. 2017. "Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicle Enrichment for Protein Biomarker Discovery in Neurological Disease; Multiple Sclerosis." *Journal of Extracellular Vesicles* 6(1): 1–10.
- Westergard, L., H. M. Christensen, and D. A. Harris. 2007. "The Cellular Prion Protein (PrPC): Its Physiological Function and Role in Disease." *Biochimic biophysica acta* 1772(6): 629–44.
- Xu, L., and G. Li. 2014. "Circulating Mesenchymal Stem Cells and Their Clinical Implications." *Journal of Orthopaedic Translation* 2(1): 1–7.
- Yang, Z. et al. 2014. "Bone Marrow Stromal Cells as a Therapeutic Treatment for Ischemic Stroke." *Neuroscience Bulletin* 30(3): 524–34.

ANEXOS

Anexo I. Western Blot

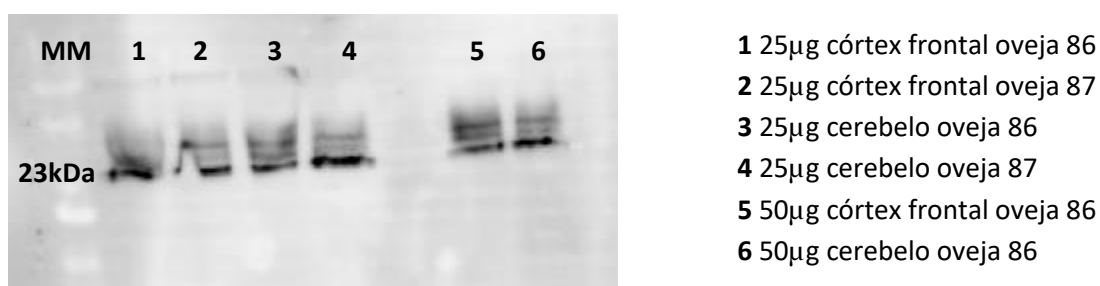
Tabla 1. Composición de los geles.

	Gel separador (12%)	Gel concentrador (5%)
Tampón 4x (mL)	2,5	1,25
Acrilamida 40% (mL)	2	0,625
H ₂ O destilada (mL)	5,5	2,9
SDS (μL)	10	50
TEMED (μL)	15	10
APS (μL)	50	25

Tabla 2. Soluciones utilizadas.

Solución	Composición
Tampón gel inferior 4x	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
Tampón gel superior 4x	1.5 M Tris-HCl pH 6.8
Tampón de carga 2x	100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 2.5% azul bromofenol al 0.5% y etanol al 10%
Tampón de electroforesis	50 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.2% SDS
Tampón de transferencia	50 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol
TTBS	20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20
TPBS	100 mM tampón fosfato pH 7,4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20

Figura 1. Western Blot con tejido cerebral y anticuerpo primario frente a CD81.



Anexo 2. RT-qPCR

Tabla 1. Sondas TaqMan y primers utilizados para la cuantificación de los miRNAs.

Nº Catálogo	Nº Ensayo	Sonda	miRNA detectado	Secuencia miRNA maduro
4427975	001278	hsa-miR-486-5p	miR-486-5p	UCCUGUACUGA GCUGCCCCGAG
4427975	002216	hsa-miR-128a	miR-128-3p	UCACAGUGAAC CGGUCUCUUU
4427975	006215_mat	xtr-miR-146	miR-146a-5p	UGAGAACUGAA UCCAUAAGGUU
4427975	000397	hsa-miR-21	miR-21-5p	UAGCUUAUCAG ACUGAUGUUGA
4427975	000457	hsa-miR-132	miR-132-3p	UACAGUCUAC AGCCAUGGUCG
4427975	002260	hsa-miR-342-3p	miR-342-3p	UCUCACACAGAA AUCGCACCCGU

Tabla 2. Primers para la amplificación de los genes de interés.

Gen	Secuencia cebadores	Longitud cebador (pb)	T _m (°C)	Longitud producto (pb)
FN1	Fw:5'GGCTGAACCGGGTAACGAA3'	19	59,5	111
	Rv:5'AGGCATGAAGCACTCAATTGG3'	21	58,8	
PAPSS2	Fw:5'AGAGGTGGCCAAGCTGTTT3'	19	59,9	107
	Rv:5'CTGCCGATTCATGGATTTTG3'	20	61,4	
CHGA	Fw:5'TGTATCGTCGAGGTCATCTCTGA3'	23	58,4	144
	Rv:5'CGAGGTCTTGGAGCTCTTTCA3'	21	58,3	
BAMBI	Fw:5'GGCTACAGGATGTCCTCACC3'	20	59,5	118
	Rv:5'TCTTTGGAGGACGTCAGCTC3'	20	60,50	
ITGA8	FW:5'TGCTGTGGCACATTTAGGAG3'	20	59,9	98
	Rv:5'TGAGCACTTTGCCTCTTTGA3'	20	59,7	
OCT4	FW:5'CGAAGCTGGACAAGGAGAAG3'	20	59.7	94
	Rv:5'AGGAGCTTGCAAATTGTTC3'	20	62.2	