

Ricerca della PrP^{Sc} nelle ghiandole surrenali di ovini di razza Sarda infettati sperimentalmente con l'agente della scrapie

Domenico SCIOTA¹, Giovanni DI GUARDO^{2*}

¹Medico Veterinario Libero Professionista, via Giotto 18, 85013 - Genzano di Lucania, (PZ);

²Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Località Piano d'Accio, 64100 - Teramo, Italia; *Indirizzo per corrispondenza: gdiuardo@unite.it.

RIASSUNTO

Le malattie da prioni (TSE) rappresentano un gruppo di malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo e gli animali. L'evento patogenetico fondamentale che risiede alla base di queste patologie è la deposizione e l'accumulo a livello del sistema nervoso centrale (SNC) dell'isoforma patologica (PrP^{Sc}) di una proteina normalmente codificata dall'ospite, la proteina prionica cellulare (PrP^C).

La Scrapie ovina rappresenta il "prototipo" delle TSE. Si ritiene che in condizioni naturali l'infezione si realizzi *per os* e che la successiva "neuroinvasione" avvenga per diffusione dei prioni lungo le fibre efferenti della componente simpatica e parasimpatica del sistema nervoso autonomo. La zona midollare del surrene si sviluppa dall'abbozzo ectodermico del simpatico e pertanto corrisponde ad un "paraganglio simpatico".

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il coinvolgimento delle ghiandole surrenali in ovini, geneticamente suscettibili (ARQ/ARQ e ARQ/AHQ) di razza Sarda infettati sperimentalmente - per via orale e per via intracerebrale - con l'agente della Scrapie.

La presenza della PrP^{Sc} è stata dimostrata – mediante indagini immunoistochimiche – a partire da 20 mesi post-infezione. L'immunoreattività ha coinvolto esclusivamente la midollare del surrene ed è risultata molto più abbondante negli ovini abbattuti in presenza

di sintomatologia clinica compatibile con la malattia. D'interesse il deposito di PrP^{Sc} anche in corrispondenza di alcuni fasci di fibre nervose che decorrono nello spessore della corticale del surrene.

I risultati del presente lavoro costituiscono una base solida per intraprendere in futuro nuovi studi al fine di valutare e approfondire il coinvolgimento della midollare del surrene nella patogenesi della Scrapie.

PARTE GENERALE

1.1 LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI TRASMISSIBILI (TSE)

1.1.1 Caratteristiche generali

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (*Trasmissible Spongiform Encephalopathies*, TSE) sono un gruppo di malattie neurodegenerative sostenute da agenti eziologici "non convenzionali" che colpiscono l'uomo e gli animali. La *Scrapie* della *pecora* e della *capra*, è considerata unanimemente il "prototipo" di tali patologie poiché è descritta nelle greggi del Regno Unito sin dal 1732; nel 1750 è stata segnalata in Francia ed è stata indicata come "tremblante" (tremore), mentre in Germania come "traberkrankheit", ovvero "malattia del trotto", denominazioni che fanno riferimento alla sintomatologia clinica neurologica caratterizzata da atassia e incoordinazione dei movimenti. Il nome della malattia, coniato in Scozia nel 1800, prende origine da "scratchie", a sua volta derivante dal verbo inglese "to scratch", per il caratteristico ed eccessivo grattamento delle pecore contagiate; in Italia la malattia è stata descritta per la prima volta in Piemonte nel 1977 da Cravero et. al (Morelli et al., 2012). Questa era la sola TSE animale conosciuta fino a 40 anni orsono, ma la comparsa della drammatica epidemia di encefalopatia spongiforme bovina (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE) nel Regno Unito nella seconda metà degli anni ottanta (Wells et al., 1987) ha drasticamente modificato lo scenario delle TSE suscitando in maniera esponenziale l'attenzione della Comunità Scientifica. Ad avvalorare ulteriormente tale affermazione si pongono pure le numerose TSE descritte, sempre nel Regno Unito, in diverse specie animali domestiche (*gatto*) e selvatiche (felidi e ruminanti selvatici mantenuti in cattività all'interno di giardini zoologici), nonché nell'uomo (variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob, vCJD, in giovani pazienti inglesi), quale conseguenza dell'esposizione (prevalentemente o

esclusivamente per via orale, con ogni probabilità) all'agente della BSE. In tal senso, appare più che lecito definire la BSE una nuova zoonosi e l'unica TSE animale, al tempo stesso, per la quale sia stato chiaramente documentato un potenziale zoonosico (Di Guardo, 2015). Da quando poi, esattamente dieci anni più tardi, si è compreso che una nuova TSE umana, denominata variante del morbo di *Creutzfeld-Jakob* (vCJD) (Will et al., 1996), sarebbe intimamente connessa in termini di causa-effetto ad una pregressa esposizione all'agente della BSE (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997), oltre al già relevantissimo interesse scientifico, ne è derivata una contestuale situazione di panico nell'opinione pubblica.

L'interesse sulle TSE, definite anche **“malattie da prioni”**, sarebbe da imputare al fatto che esse possono colpire l'uomo e diverse specie animali, domestiche e selvatiche (Tabella n. 1). Le TSE, in condizioni naturali, tendono a manifestarsi prevalentemente nei ruminanti.

Per quanto riguarda la BSE, osservata originariamente nel Sud della Gran Bretagna nel Novembre 1986, diagnosticata per la prima volta presso il Central Veterinary Laboratory di Weybridge e segnalata successivamente in diversi Paesi europei, tra cui l'Italia, essa è una malattia neurodegenerativa cronica, ad esito costantemente mortale, che colpisce specialmente le vacche da latte di 3-8 anni, con un picco d'incidenza in quelle di 4-6 anni. Il periodo d'incubazione è di 3-8 anni (in media 4-5 anni) e la maggior parte degli animali contrae l'infezione ad un'età inferiore ai 2 anni. Si ritiene che l'esposizione della popolazione bovina inglese all'agente della BSE sia databile tra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80, in concomitanza con la produzione, mediante trattamenti tecnologici più blandi (drastica riduzione delle temperature) di quelli usati in precedenza, di farine di carne ed ossa di ruminanti contaminate da un agente Scrapie-simile (trasmissione orizzontale indiretta) presumibilmente derivato dagli ovini, specie in cui la Scrapie è endemica nel Regno Unito. Ad aggravare la situazione c'era inoltre la mancata estrusione dei grassi delle suddette farine, complice il significativo calo dei prezzi che queste materie prime avevano registrato nel frattempo sui mercati. Tuttavia, in un rapporto del Parlamento inglese pubblicato nell'Ottobre 2000 (Report of the BSE Inquiry, UK Parliament, October 2000), si è prospettato che la BSE abbia avuto origine, all'inizio degli

anni '70, a seguito di una mutazione spontanea intervenuta a livello del gene della PrP di un animale di specie bovina o di altra specie, quindi, in definitiva, attraverso modalità sostanzialmente non difformi rispetto a quanto si verificherebbe in corso di CJD sporadica dell'uomo. L'epidemia sarebbe quindi stata rinfocolata, a livelli esponenziali, dal riciclaggio in alimentazione bovina di tessuti provenienti da bovini BSE-infetti, attraverso modalità di contagio intraspecifico (bovini-bovini) di tipo "simil-cannibalistico", allo stesso modo in cui, alla fine degli anni '50, era successo in Papua-Nuova Guinea con l'epidemia di Kuru. La crescita di questa epidemia, quindi, ha raggiunto livelli devastanti nel Regno Unito; si ritiene infatti che in un decennio abbia prodotto circa 1 milione di capi infetti con quasi 190.000 casi di malattia clinicamente manifesta; il picco si è riscontrato nel 1992 con oltre 37.000 nuovi casi, contro i poco più di mille del 2000. Il Governo inglese decise, a partire dal luglio del 1988, il divieto di utilizzo di farine di carne contenenti proteine di ruminanti per l'alimentazione dei bovini, mentre nel 1990 entrò in vigore l'obbligo di distruggere i tessuti di origine bovina ("*specified bovine offals*", SBOs) che, per analogia con la Scrapie, venivano ritenuti potenzialmente infetti. Dopo questi provvedimenti, l'epidemia di BSE ha subito negli anni una consistente riduzione. La Comunità Europea inoltre, a seguito dell'evidenza ottenuta nel 1997 che la vCJD fosse legata all'esposizione umana all'agente della BSE (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997), ha posto particolare attenzione sulla possibilità che l'agente della BSE causale potesse circolare nella popolazione ovina inducendovi la comparsa di una forma clinicamente indistinguibile dalla Scrapie e ha reso pertanto obbligatori, in ciascuno Stato Membro, programmi di sorveglianza, sia attiva sia passiva (Regolamento 999/2001/CE e successive modifiche).

L'evento patogenetico fondamentale in tutte le TSE umane e animali è costituito da una modificazione conformazionale post-traslazionale di una proteina normalmente codificata dall'ospite, la proteina prionica cellulare (PrP^c), nella sua isoforma patologica, la proteina prionica Scrapie-associata (PrP^{Sc}), che si accumula progressivamente a livello soprattutto del sistema nervoso centrale (SNC), e in minor misura a livello di diversi distretti extra-neurali dell'ospite (Di Guardo., 2015).

Tutte le TSE presentano alcune caratteristiche biologiche comuni: 1) Lunghi periodi di

incubazione (mesi-anni); 2) Esordio subdolo e poco specifico; 3) Quadro clinico progressivo caratterizzato da una serie di disturbi neurologici e comportamentali, con esito costantemente fatale; 4) Presenza di lesioni di tipo regressivo (distrofia neuroassonale, neuropatia degenerativa), pressoché esclusivamente localizzate a livello di SNC e apprezzabili solo istologicamente; 5) Assenza di risposta infiammatoria o immunitaria morfologicamente dimostrabile, almeno in senso “classico”; 6) Accumulo, sia a livello di SNC, sia di tessuti periferici, linfatici ed extra-linfatici dell’ospite (seppur non costantemente), di PrP^{Sc}; 7) Trasmissibilità ad una varietà di specie animali sia in condizioni naturali che sperimentali (Landini & Di Guardo, 2013).

A supporto della capacità di questi agenti di superare la cosiddetta “barriera di specie”, cui si è già accennato in precedenza, è stata dimostrata da tempo la suscettibilità della specie ovina e caprina all’infezione sperimentale sostenuta dall’agente della BSE (Foster et al., 1993) e successivamente si è giunti all’identificazione di più casi di infezione naturale in capre sempre ad opera dell’agente della BSE (Eliot et al., 2005; Spiropoulos et al., 2011).

La trasmissione inter-specifica degli agenti responsabili delle TSE sia in condizioni naturali che sperimentali, comunque, può avere esiti diversi che possono variare in modo assolutamente imprevedibile. Si può avere infatti una completa assenza di malattia, una forma subclinica o con un decorso piuttosto lungo, oppure una trasmissione totalmente efficace con segni di malattia conclamati. Quando un ospite risulta totalmente resistente all’infezione da prioni provenienti da un’altra specie si parla di “barriera di specie assoluta”. Ad esempio il coniglio sembra essere resistente alla trasmissione intracerebrale di prioni provenienti da molte specie, come nel caso di ceppi murini di Scrapie, CJD umana, kuru e BSE (Vorberg et al., 2003).

Accanto alle forme “classiche” di TSE che colpiscono i ruminanti, con particolare riferimento al bovino (BSE) e agli ovini e caprini (Scrapie), recenti studi hanno dimostrato l’esistenza di forme cosiddette “atipiche” di malattia provocate da ceppi prionici aventi profili immunobiochimici e immunoistochimici della PrP^{Sc}, nonché profilo neuro-istolesivo diversi da quelli responsabili delle forme classiche. Queste forme sono

sostenute dai ceppi Nor98 e Nor98-like, identificati per la prima volta nel 1998 in una pecora norvegese (Benestad et al., 2008), annoverando al loro interno anche casi di BSE “atipica” descritti nei primi anni del terzo millennio e denominate BASE (*Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy*) (Biacabe et al., 2004; Casalone et al., 2004), sostenuti a loro volta da ceppi “BSE-H” (*high-type*) e “BSE-L” (*low-type*) in base al pattern di glicosilazione ed al peso molecolare della PrP^{Sc} (Buschmann et al., 2006). Oltre ad essere ben distinte sotto il profilo epidemiologico, Scrapie “classica” e “atipica” costituiscono due entità nosologiche differenti dal punto di vista clinico-patologico e immunobiochimico, potendo anche coesistere (Mazza et al., 2010). L’origine della Scrapie “atipica” rimane a tutt’oggi sconosciuta, sebbene sia diffusamente ritenuta una forma naturale, sporadica e “non contagiosa” di Scrapie (Di Guardo, 2015).

Le TSE, tuttavia, non si limitano a colpire le sole specie ovina, caprina e bovina, ma possono ritrovarsi anche in altri ungulati, alcuni unguicolati nonché alcuni primati non umani.

Non possiamo dimenticare, infatti, la *Chronic Wasting Disease* (CWD) o malattia del dimagrimento cronico dei Cervidi segnalata per la prima volta in Colorado (USA) nel 1967 (Williams & Young, 1980; Williams & Young, 1992); la malattia, inizialmente correlata alla cattività e associata a carenze nutrizionali e allo stress, è stata riconosciuta come una nuova TSE nel 1978 (Williams & Young, 1980; Williams & Young, 1992). L’origine della CWD non è nota, sebbene possa essere collegata alla trasmissione dell’agente patogeno da allevamenti infetti per contatto accidentale con i cervidi selvatici o, *ex novo*, da una forma sporadica della malattia presente in animali a vita libera (Spraker et al., 2002; Miller & Williams, 2003; Bollinger et al., 2004; Kahn et al., 2004). La diffusione dell’agente della CWD avviene attraverso feci, urina, saliva, sangue e velluto dei palchi provenienti da animali infetti, anche durante la fase preclinica dell’infezione (Miller & Williams, 2002; Spraker et al., 2002; Gough & Maddison, 2010), rendendo in tal modo difficile il contenimento dell’infettività presente nell’ambiente. La comparsa della vCJD in seguito all’esposizione umana all’agente della BSE (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997) ha posto interrogativi importanti anche riguardo alla possibilità di trasmissione dell’agente della CWD all’uomo, soprattutto in considerazione del fatto che

in Nord America migliaia di cervi vengono cacciati ogni anno e che non è attualmente obbligatorio sottoporre a indagini diagnostiche questi animali (salvo alcune deroghe in vigore nei diversi Stati). A ciò bisogna aggiungere che tessuti quali muscolo scheletrico, cuore e grasso (Angers et al., 2006; Race et al., 2009), oltre a sistema linforeticolare (SLR), sistema nervoso centrale e periferico, possono albergare consistenti livelli di infettività, costituendo in tal modo un serio elemento di pericolo in ambito di sanità pubblica nel caso in cui venisse dimostrato il potenziale zoonosico dell'agente di malattia. La CWD sembra presentare a oggi un potenziale rischio zoonosico molto basso (Kong et al., 2005; Tamguney et al., 2006; Sandberg et al., 2010; Barria et al., 2011), anche se non sono del tutto chiare l'origine, l'esistenza di ceppi diversi di agente, la sensibilità/resistenza genetica degli individui e le modalità di trasmissione dell'infezione (Landini & Di Guardo, 2013).

Dobbiamo inoltre ricordare l'encefalopatia spongiforme felina (*Feline Spongiform Encephalopathy*, FSE), l'encefalopatia spongiforme del visone (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME) e le encefalopatie spongiformi degli ungulati selvatici nei giardini zoologici (Ryou, 2007).

Meritevole di segnalazione è anche la recente descrizione di una nuova malattia prionica (*Camel Prion Disease*, CPD) nei camlidi, e, più precisamente nel dromedario (*Camelus dromedarius*) all'interno di una popolazione sahariana dell'Ouargla, nel sud-est dell'Algeria (Babelhadj et al., 2018).

Infine, per quanto concerne i primati non umani (*Non-Human Primates*, NHP), sono stati diagnosticati alcuni casi in uno zoo francese tra il 1996 e il 1999 (Imran et al., 2011).

Nella specie umana le malattie da prioni sono conosciute da molto tempo. Nella tribù di lingua Fore della Papua Nuova Guinea l'antropofagia rituale o, per meglio dire, l'usanza cannibalistica di mangiare durante alcuni riti funerari, il cervello dei cadaveri, ha determinato la comparsa di una TSE denominata *Kuru*, la quale è stata la prima causa di mortalità in queste popolazioni durante la prima metà del XX secolo. Attualmente le TSE umane sono suddivisibili in tre gruppi: **sporadiche**; (CJD sporadica, *Insonnia sporadica fatale*); **genetiche**, (CJD Familiare, sindrome di *Gerstmann-Sträussler-Scheinker*/GSS,

Insonnia Familiare Fatale/FFI) che si comportano come vere e proprie malattie ereditarie pur essendo trasmissibili sperimentalmente al pari di tutte le altre TSE (Pocchiari, 1994); **iatrogene** (CJD *iatrogena*), responsabile di una grave epidemia che ha causato la morte di 250 pazienti e trasmessa a seguito della somministrazione di estratti ipofisari contaminati, nonché a seguito dell'effettuazione di interventi chirurgici mediante strumenti e/o attrezzature contaminate (Pocchiari, 1994; Di Guardo, 2015).

Infine, come precedentemente esposto, il passaggio dell'agente della BSE all'uomo ha causato la comparsa della vCJD, responsabile di oltre 200 decessi (la maggior parte dei quali nel Regno Unito) e di una delle più grandi crisi economiche, sanitarie e alimentari della storia (Aguzzi & Heikenwalder, 2006). La presunta trasmissione dell'infezione attraverso le trasfusioni di sangue ha indotto l'Unione Europea ad adottare una serie di ulteriori misure restrittive finalizzate al contenimento del rischio di esposizione umana all'agente della BSE e alla tutela della salute pubblica.

Tabella n. 1: Elenco delle TSE umane e animali (Landini & Di Guardo, 2013), con modifiche

TSE	OSPITE NATURALE	VIA DI TRASMISSIONE
Scrapie	Pecora, capra	<ul style="list-style-type: none"> • Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della Scrapie) • Trasmissione orizzontale e, con ogni probabilità, anche verticale • Trasmissione per via "iatrogena" attraverso l'impiego di vaccini allestiti con tessuto cerebrale di ovini Scrapie-infetti
Encefalopatia spongiforme bovina (BSE)	Bovino, capra	<ul style="list-style-type: none"> • Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE) • Trasmissione verticale non accertata • Sperimentalmente trasmissibile sia alla capra sia alla pecora
Chronic wasting disease (CWD)	Cervo dalla coda bianca, alce, cervo dalla coda nera, wapiti, cervo mulo	<ul style="list-style-type: none"> • Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della CWD) • Trasmissione orizzontale
Encefalopatia spongiforme del visone (TME)	Visone	Acquisita (fonte sconosciuta)
Encefalopatia spongiforme felina (FSE)	Gatto, puma, ocelot, ghepardo, tigre, leone, gatto dorato asiatico	<ul style="list-style-type: none"> • Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE. • Trasmissione verticale (ipotizzata, non accertata)

Encefalopatia spongiforme degli ungulati esotici	Kudu, nyala, antilope	Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE
Scrapie "atipica"	Pecora, capra	Sconosciuta
Encefalopatia amiloidotica spongiforme bovina (BASE)	Bovino	Sconosciuta
Encefalopatia spongiforme del dromedario (CPD)	Dromedario	Sconosciuta
Kuru	Uomo	Ingestione di parti di cadaveri in occasione di riti funerari (Papua-Nuova Guinea)
Variante del morbo di Creutzfeld-Jakob (vCJD)	Uomo	<ul style="list-style-type: none"> • Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE • Trasfusioni di sangue di pazienti vCJD-infetti
Forma sporadica del morbo di Creutzfeld-Jakob (sCJD)	Uomo	<ul style="list-style-type: none"> • Sconosciuta • Mutazione somatica o conversione spontanea della PrP^c in PrP^{Sc}
Forma iatrogena del morbo di Creutzfeld-Jakob (iCJD)	Uomo	Esposizione accidentale, conseguente a procedure e/o trattamenti medico-chirurgici, in cui venga utilizzato materiale CJD-infetto
Forma familiare del morbo di Creutzfeld-Jakob (fCJD)	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>

Sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
Insonnia familiare fatale (FFI)	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
Insonnia fatale sporadica	Uomo	Sconosciuta

1.1.2 L'agente patogeno

Una delle questioni ancora oggi oggetto di dibattito sulle TSE riguarda la natura eziologica dell'agente patogeno. Queste patologie, infatti, vengono definite infettive, trasmissibili e sostenute da agenti eziologici di natura biologica dotati di caratteristiche “non convenzionali”.

Nel corso degli anni le teorie eziologiche sono state diverse e numerose, alcune delle quali hanno attualmente un valore puramente storico, essendo state enunciate da autorevoli scienziati e considerate potenzialmente valide fino al 1982, quando *Stanley Prusiner* enunciò la rivoluzionaria “Teoria Prionica”, oggi ampiamente accettata dalla comunità scientifica (Prusiner, 1998). Tuttavia, alcune fra le suddette teorie sono ancora oggi oggetto di studio (Manuelidis et al., 2007; Manuelidis, 2010).

Le teorie che hanno preceduto quella di Prusiner sono caratterizzate da un aspetto comune. In generale la maggior parte di esse sostiene che le TSE siano causate da agenti simil-virali o, comunque, da agenti dotati di materiale genetico che ne permetta la replicazione a livello cellulare.

Brevemente descriviamo queste teorie qui di seguito:

- **Teoria dei Virus Lenti.** La definizione di “virus lento”, coniata in Islanda nel lontano 1954 origina da due caratteristiche comuni ad altrettante malattie coesistenti in quel Paese, vale a dire Maedi-Visna e sulla Scrapie. Questa teoria nasceva sulla base di due caratteristiche comuni a entrambe le suddette malattie: **1)** il lungo periodo di incubazione; **2)** le dimensioni dell'agente infettante, che in seguito a prove di laboratorio vennero stimate intorno ai 40 nm.

- **Ipotesi del Virus Filamentoso.** Secondo questa ipotesi, la Scrapie sarebbe sostenuta da

un virus che morfologicamente coinciderebbe con le fibrille di amiloide Scrapie-associate (*Scrapie-Associated Fibrils*, SAF). Tuttavia, il diametro delle SAF (4-6 nm) è troppo ridotto per contenere acidi nucleici. Inoltre, è stato dimostrato che l'infettività non sarebbe associata alle SAF.

- **Ipotesi del Viroide.** Studi di inattivazione mediante l'uso di radiazioni ionizzanti indussero a ritenere che l'agente eziologico fosse compatibile con una molecola di RNA di 200-400 nucleotidi, sprovvista di proteine.

- **Ipotesi del Retrovirus.** Questa ipotesi muove le sue premesse dall'osservazione, in corso di CJD, della presenza di molecole di RNA a basso peso molecolare simili a quelle retrovirali. Tuttavia, la mancata dimostrazione di particelle virali e le particolari caratteristiche fisico-chimiche degli agenti delle TSE rendono questa ipotesi scarsamente attendibile.

- **Teoria del Virino.** L'agente patogeno sarebbe costituito da un acido nucleico associato ad una proteina codificata dall'ospite. Questa teoria sarebbe in grado di spiegare, al pari di quella prionica, la mancata reazione immunitaria da parte dell'organismo-ospite costantemente osservata in corso di TSE umane e animali. Una variante di questa teoria (**teoria dell'oloprione**) suggerisce che anche l'acido nucleico sia di origine cellulare, con la particella infettante costituita da PrP^{Sc} (apoprione) e acido nucleico (coprione) (Di Guardo, 2015).

-**Teoria dell'Amiloidosi Virus-Indotta.** Secondo questa teoria, le TSE sarebbero sostenute da un virus la cui attività replicativa si esaurirebbe prima dell'esordio clinico della patologia, quindi le SAF sarebbero il prodotto della replicazione virale (Prusiner, 1998; Di Guardo, 2015).

Il matematico J. Griffith fu colui che, nel 1967, intuì per primo che l'agente eziologico della Scrapie e delle altre TSE fino ad allora conosciute era di natura proteica. Successivamente Prusiner, riprendendo l'ipotesi proposta da Griffith, dimostrò che le caratteristiche fisico-chimiche dell'agente della Scrapie erano molto diverse da quelle dei virus, dei viroidi e dei plasmidi, pervenendo nel 1982, alla fondamentale conclusione che

tale malattia fosse sostenuta da: “*una piccola particella infettante di natura proteica, resistente ai trattamenti di inattivazione in grado di modificare gli acidi nucleici*”. A seguito di questa memorabile scoperta egli coniò il termine “**Prion**” (*PR*oteinaceous *IN*fectious *ON*ly), tradotto nella nostra lingua in “prione” (Prusiner, 1982). L’enunciazione della teoria prionica valse a Prusiner il premio *Nobel* per la Medicina nel 1997 (Prusiner, 1998).

La teoria prionica, seppur comprovata sperimentalmente, tuttavia spiegherebbe con maggiore difficoltà, rispetto alla teoria virale, l’esistenza di più ceppi di agenti di Scrapie, tutti ben caratterizzati dal punto di vista clinico, istopatologico e biochimico, fenomeno quest’ultimo difficilmente plausibile in assenza di possesso, da parte dell’agente causale, di acidi nucleici. Ciò collide, infatti, con un dogma centrale della biologia molecolare, che postula che gli agenti infettivi che trasmettono malattie debbano possedere acidi nucleici, per propagare l’infezione in un organismo ospite. La scoperta dei prioni ha dimostrato pertanto che, anche in assenza di acidi nucleici un agente di natura proteica può moltiplicarsi e provocare malattia (Di Guardo, 2015).

Successivi studi hanno dimostrato che la struttura primaria del “prione” coincide con quella di una proteina normalmente espressa dall’ospite, definita “proteina prionica cellulare (PrP^C) e codificata da uno specifico gene (il gene *PRNP*) (Oesch et al., 1985; Prusiner, 1998; Aguzzi & Heppner, 2000; Aguzzi & Polymenidou, 2004).

Furono due, però, le osservazioni cruciali che confermarono la validità della teoria prionica. La prima fu la creazione di ceppi transgenici di topi mediante delezione omozigote del gene *PRNP* (topi “*knockout*”), che, quindi, avendo perso la capacità di esprimere la PrP^C, risultavano refrattari nei confronti della trasmissione della patologia (Bueler et al., 1993). La seconda fu l’isolamento dal tessuto cerebrale di animali affetti da TSE dell’isoforma forma patologica della PrP^C, nota come PrP^{Sc} (Prusiner, 1998). Questi dati ancora oggi costituiscono le prove più solide della teoria enunciata da Stanley Prusiner.

Riassumendo quanto finora esposto, possiamo affermare che tutte le TSE sin ora scoperte

siano causate da “prioni”; tali malattie presentano una particolare complessità patobiologica, poiché nel determinismo del processo lesivo che le contraddistingue, si vedono convergere un agente infettivo trasmissibile esogeno (seppur “*sui generis*”) e un fattore genetico endogeno, cioè proprio dell’ospite. Il primo di questi è costituito dall’isoforma patologica (PrP^{Sc}) della proteina prionica cellulare (PrP^C) che, secondo la teoria di Prusiner, coinciderebbe totalmente con l’agente causale (Di Guardo, 2015).

Nonostante la teoria prionica sia stata ampiamente dimostrata in ambito sperimentale, anche alla luce dei postulati di Koch (Legname et al., 2004), esistono tuttora alcuni studiosi che sostengono l’ipotesi virale; gli stessi considerano la PrP^{Sc} come il prodotto patologico dell’infezione virale e non il vero e proprio agente causale (Pocchiari et al., 1994; Manuelidis, 2007, 2010; Couzin-Frankel, 2011).

Dal punto di vista biomolecolare la PrP^C, pur possedendo la stessa sequenza aminoacidica (struttura primaria), si differenzia dalla PrP^{Sc} per la conformazione spaziale (struttura secondaria, tipica delle proteine globulari solubili in acqua, come le albumine), nonché per la struttura terziaria e quaternaria. Infatti, mentre nella PrP^C le catene polipeptidiche hanno una struttura prevalentemente ad “ α -eliche” (40% di α -eliche e 3% di β -foglietti), le modificazioni post-traslazionali che comportano l’acquisizione di una struttura prevalentemente a “ β foglietti” (30% di α -eliche e 40% di β -foglietti) sarebbero in grado di conferire patogenicità alla molecola della PrP^{Sc}, marcando al contempo le differenze tra le due isoforme proteiche. Questi cambiamenti conformazionali (Fig. n. 1) conferiscono alla PrP^{Sc}, ovvero all’agente infettante (il prione), delle caratteristiche nuove: esso diviene parzialmente resistente alla proteolisi (da cui la denominazione alternativa di PrP^{res}, contrapposta a quella di PrP^{sen}, che identifica appunto la PrP^C) e insolubile in detergenti deboli e soluzioni saline (Sparkes et al., 1986; Aguzzi & Heppner, 2000; Aguzzi & Polymenidou, 2004; Di Guardo, 2015). In effetti, ad avvalorare il concetto di “agenti biologici di natura non convenzionale”, contribuisce anche l’eccezionale resistenza dei medesimi nei confronti di agenti fisici quali calore, radiazioni eccitanti e ionizzanti, ultrasuoni, nonché di agenti chimici quali, formaldeide e glutaraldeide ed altri detergenti e disinfettanti, agenti che risulterebbero sicuramente inattivanti per i virus convenzionali. L’inattivazione, o quantomeno l’abbattimento della carica infettante (infettività)

richiedono infatti l'impiego di una temperatura di 133 °C a 3 bar per 20 minuti, oppure l'utilizzo di soluzioni disinfettanti clorate come l'ipoclorito di sodio (NaClO) 2% per 1 h, di idrossido di sodio (NaOH) 2N per 1 ora (o 1N per 2 ore) o idrossido di sodio (NaOH) 2M in autoclave a 121 °C per 30 minuti, oppure di acido formico al 95-100% per 1 ora, nonché di aldeide formica (HCHO) 98% per 1 ora (Landini & Di Guardo, 2013; Di Guardo, 2015).

La PrP^{Sc} ha un peso molecolare di 33-35 kDa e, se sottoposta all'azione della proteinasi K, viene parzialmente degradata assumendo un peso molecolare pari a 27-30 kDa. Quest'ultima molecola, polimerizzando, dà luogo a fibrille simil-amiloidotiche denominate SAF (*Scrapie-associated fibrils*) o *prion rods*, evidenziabili al microscopio elettronico. Tali fibrille, di 20 nm di diametro, di 100-200 nm di lunghezza e composte da 2-3 protofilamenti dritti o attorcigliati di 4-6 nm di diametro, si organizzano in depositi presenti a livello cerebrale in tutte le TSE umane e animali (Landini & Di Guardo, 2013).

Alla luce di quanto sopra, è ragionevole ritenere che l'assenza di una risposta infiammatoria ed immunitaria nei confronti della PrP^{Sc} (caratteristica comune a tutte le TSE) dipenda dal fatto che essa sia totalmente connessa alla sua controparte cellulare (PrP^C) dall'omologia della sequenza aminoacidica (struttura primaria), e per questo sarebbe riconosciuta come “*self*” da parte del sistema immunitario dell'ospite (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998; Aguzzi & Heppner, 2000; Aguzzi & Polymenidou, 2004; Di Guardo, 2015).

Tuttavia recenti studi di crio-elettronmicroscopia (cryo-EM) e di diffrazione a raggi X hanno consentito di caratterizzare la struttura della PrP^{Sc} intimamente connessa ad un β -solenioide a 4 gradini (4R β S) (Spagnoli et al, 2019).

L'evento dominante che caratterizza la conversione della PrP^C in PrP^{Sc} si verifica dopo che la prima ha raggiunto la membrana cellulare, alla quale si lega mediante un legame di tipo “glicosil-fosfatidil-inositolico” (“*GPI-anchor*”) localizzato in corrispondenza dell'estremità C-terminale della PrP^C. Più in particolare, sarebbero i due domini della struttura prevalentemente ad α -elica della PrP^C a essere coinvolti nel processo di conversione post-traslazionale nella struttura prevalentemente a β -foglietti propria della

PrP^{Sc}. Questo processo di conversione, inoltre, potrebbe esser reso ben più efficiente dalla presenza di alcune particolari proteine denominate “chaperonine”, mentre è stato recentemente documentato, in tale contesto, l’intervento di reazioni di scambio fra il gruppo tiolico terminale della PrP^{Sc} ed il legame disolfuro intramolecolare della PrP^C. I meccanismi molecolari di questo processo sono stati approfonditamente studiati da Prusiner e si basano su due distinti modelli (Prusiner, 2001; Aguzzi & Polymeridou, 2004). Il primo modello, denominato “*template-directed refolding*”, prevede l’interazione tra molecole esogene di PrP^{Sc} e molecole endogene di PrP^C. La PrP^{Sc}, una volta penetrata all’interno dei neuroni e, in minor misura, negli astrociti, si localizzerebbe a livello delle cisterne dell’apparato del Golgi. Qui la PrP^C derivante dalla membrana cellulare interagirebbe con la PrP^{Sc} e così, a spese del *pool* di PrP^C, si formerebbe PrP^{Sc} che si accumulerebbe in maniera esponenziale in sede intracellulare. Si formerebbe, pertanto, una molecola eterodimerica costituita da due subunità e ciò determinerebbe la modificazione della PrP^C; alla rottura del dimero seguirebbe la liberazione di due molecole trasformate. La PrP^C, quindi, in qualche modo si denaturerebbe (perderebbe la sua struttura terziaria) per poi rinaturarsi (*refold*) sotto l’influenza di una molecola di PrP^{Sc}. In condizioni di normalità, un’elevata “*barriera energetica*” impedirebbe la conversione spontanea della PrP^C in PrP^{Sc}. Il secondo modello, denominato “*seeded nucleation*” o “*nucleation polymerization*”, prevede invece che la PrP^C e la PrP^{Sc} coesistano in un equilibrio termodinamico reversibile. Il reclutamento e l’aggregazione in fibrille amiloidi di forme monomeriche di PrP^{Sc} avverrebbero solo quando diverse molecole di PrP^{Sc}, per motivi ancora sconosciuti, si organizzano in strutture altamente ordinate e quindi interagiscono insieme con una molecola normale, causandone un’alterazione strutturale. Questo cambiamento produrrebbe una reazione a catena in cui le molecole appena trasformate modificano la forma di altre molecole di PrP^C e così via, in un processo autocatalitico responsabile del progressivo accumulo di PrP^{Sc}. In questo secondo modello, la PrP^{Sc} diviene stabile all’interno della suddetta struttura simil-cristallina; la successiva frammentazione di aggregati di PrP^{Sc} può tuttavia aumentare il numero di nuclei (“*seed*”) di cristallizzazione, i quali possono a loro volta reclutare altre molecole di PrP^C con conseguente replicazione dell’agente prionico, il che conduce inesorabilmente a morte le cellule nervose che lo contengono (degenerazione spongiforme del tessuto cerebrale). In

questo caso, sarebbe corretto parlare di “amplificazione” e non di replicazione, in quanto quest’ultima sarebbe una prerogativa degli agenti infettivi convenzionali dotati di un acido nucleico (Fig. n. 2) (Aguzzi & Heppner, 2000; Landini & Di Guardo, 2013; Di Guardo, 2015).

I suddetti modelli potrebbero essere validi anche per le TSE su base ereditaria, in cui singole mutazioni puntiformi a carico del gene *PRNP* porterebbero alla conversione della PrP^C in PrP^{Sc}. Caughey e Baron (2006), confermano che la conversione possa avvenire in seguito al contatto tra PrP^C e PrP^{Sc}. Si ritiene che tale processo di interazione/conversione possa avvenire sulla superficie cellulare e/o all’interno di endosomi che “sequestrerebbero” gli aggregati proteici della membrana cellulare. Inoltre, la conversione della PrP^C priva della normale “ancora” di glicosil-fosfatidil-inositolo che, come già accennato, la connette alla membrana cellulare, si ritiene possa portare all’accumulo extracellulare di sostanza amiloide (Fig. n. 3).

Uno degli aspetti più controversi della teoria prionica è rappresentato dall’esistenza di diversi “ceppi” di agente. Il concetto di ceppo, infatti, fino ad oggi è stato applicato ad agenti biologici dotati di materiale genetico proprio e risulterebbe poco appropriato riferendosi ad un agente infettante dotato di natura esclusivamente proteica. Per “ceppo prionico” si intende un isolato che, se inoculato in uno stesso ospite (riferendoci in genere alla specie murina dal punto di vista sperimentale), si caratterizza per l’induzione di un fenotipo clinico-patologico diverso per durata del periodo di incubazione, profilo neuro-istolesivo e coinvolgimento di specifici distretti neuro-anatomici. I ceppi in genere mantengono le proprie caratteristiche fenotipiche anche a seguito di ripetute trasmissioni seriali. La prima dimostrazione dell’esistenza di differenti ceppi di prioni è stata ad opera di Pattison e Millson nel 1961, quando trasmissioni consecutive di un caso di Scrapie ovina in capre portarono alla comparsa di due distinti fenotipi clinici che si mantenevano costanti dopo trasmissione da capra a capra. I primi cinque ceppi di Scrapie vennero caratterizzati da Fraser et al. (1973) e ulteriori ceppi vennero scoperti grazie agli studi di Kimberlin et al. (1987). Successivamente, passaggi seriali di omogenati di tessuto cerebrale alberganti diversi isolati di Scrapie su topi “*inbred*” hanno portato all’isolamento di ceppi che differiscono tra loro e che mantengono costanti le loro caratteristiche quando

re-inoculati nel topo (Bruce & Fraser, 1991). Bessen e Marsh (1992), studiando due ceppi della TME del visone, fornirono importanti elementi a supporto del fatto che la specificità di ciascun ceppo derivasse dalla struttura conformazionale della PrP^{Sc}. Il trattamento con enzimi proteolitici determinava nei due ceppi in esame una differente degradazione della PrP^{Sc}, fatto che implicava l'esistenza di due diverse conformazioni della proteina, con comportamenti distinti nei confronti della degradazione enzimatica. Tradizionalmente i ceppi sono stati caratterizzati in base alle proprietà biologiche e biochimiche. Per la caratterizzazione biologica i ceppi vengono distinti sulla base del periodo di incubazione e del profilo clinico e neuro-istolesivo dopo trasmissione in un ospite recettivo (generalmente topi da laboratorio), nonché della capacità di trasmissione a specie diverse (Fraser & Dickinson, 1973; Bruce, 2003). La lunghezza dell'intervallo tra l'esposizione all'agente infettivo e la fase clinica della malattia, che normalmente può superare i 2 anni in animali da laboratorio e i 10 anni nell'uomo, in condizioni sperimentali è altamente prevedibile e costante. È inoltre altamente ripetibile quando diversi gruppi di topi, omogenei dal punto di vista genetico, vengono inoculati con dosi equivalenti dello stesso ceppo di TSE. Tuttavia, differenti ceppi testati nella stessa linea di topi mostrano periodi di incubazione significativamente diversi. Il periodo di incubazione dipende infatti dal ceppo di agente, sebbene risulti pure influenzato da fattori genetici. Nei topi da laboratorio, ad esempio, sono stati trovati due alleli del gene *PRNP*: *prnp-a* che presenta gli aminoacidi leucina e treonina ai codoni 108 e 189; e *prnp-b* con gli aminoacidi fenilalanina e valina agli stessi codoni (Westaway et al., 1989). Il genotipo che mostra il più breve tempo di incubazione è *prnp-a* per alcuni ceppi, ma per altri è *prnp-b* (Bruce, 1993).

I ceppi di TSE mostrano anche differenze radicali e riproducibili nel tipo, nella gravità e nella distribuzione delle modificazioni patologiche che producono nel cervello dei topi sperimentalmente infettati (Fraser, 1993). Quantificando il grado di vacuolizzazione di 9 distinte aree cerebrali di sostanza grigia e 3 di sostanza bianca è possibile determinare, per ciascun ceppo, un caratteristico profilo delle lesioni (“*lesion profile*”) (Fraser & Dickinson, 1968; Bruce & Fraser, 1991). I ceppi, infine, possono anche differire sulla base della diversa capacità di indurre aggregati di PrP^{Sc} morfologicamente diversi, che vanno

da piccoli depositi a voluminose placche amiloidi localizzate in aree cerebrali diverse. Sebbene il tempo di incubazione e il profilo delle lesioni siano di grande utilità nel comprendere e discriminare i ceppi, la tipizzazione biologica dei ceppi pone diversi limiti: dalla variabilità della risposta individuale degli animali inoculati, ai fattori soggettivi legati all'esperienza dell'operatore che assegna il profilo delle lesioni, ai lunghi tempi di attesa ed agli elevati costi relativi alla sperimentazione animale.

Sulla capacità di trasmissione a specie diverse, già in precedenza abbiamo introdotto il concetto di “barriera di specie” o “barriera di trasmissione”, alla cui conoscenza hanno contribuito gli studi su animali transgenici (topi, *in primis*) e, più recentemente, quelli effettuati sull'arvicola (*Myodes glareolus*), un roditore cui si associano elevata efficienza e ridotti tempi di trasmissione di numerosi ceppi di TSE umane e animali. A tal proposito, risultano molto interessanti una serie di studi secondo cui l'arvicola risulterebbe sensibile a vari ceppi di prioni della CJD, con risultati simili a quelli ottenuti in topi recanti il gene *PRNP* umano (Nonno et al., 2006). Secondo tale concetto, la trasmissibilità interspecifica delle TSE in condizioni sia naturali sia sperimentali dipenderebbe, a prescindere dalla via di infezione e dal tessuto utilizzati (che rappresentano comunque due fattori condizionanti l'efficienza di trasmissione), dall'omologia di struttura primaria fra PrP^{Sc}, da un lato, e PrP^C dell'ospite, dall'altro. In generale, al crescere dell'omologia di sequenza tra le due molecole a livello di determinate regioni, aumenterebbero di pari passo le probabilità di trasmissione interspecifica. Tuttavia, un'accentuata attività replicativa dell'agente infettante è stata dimostrata nel topo, pur in assenza di sintomatologia clinica, a seguito dell'infezione sperimentale sostenuta dal ceppo Sc237 di Scrapie del criceto. Ciò potrebbe mettere in discussione il concetto di “barriera di specie” almeno nella sua “classica” accezione molto incentrata su parametri clinici (Di Guardo, 2015). In passato, nel tentativo di aggirare l'ostacolo rappresentato dalla “barriera di specie”, la PrP^C di diverse specie animali è stata espressa in topi transgenici (Collinge et al., 1995; Scott et al., 1999; Aguzzi & Polymenidou, 2004). I modelli transgenici hanno infatti ridotto notevolmente questa barriera; ad esempio, quella presente tra il topo e l'hamster è stata efficacemente eliminata sviluppando topi recanti il gene *PRNP* (Prusiner et al., 1990; Aguzzi & Happner, 2000).

Per quanto concerne la caratterizzazione biochimica dei ceppi, Bessen e Marsh (1992)

studiando due ceppi della TME del visone trasmessi in hamster, dimostrarono che l'analisi elettroforetica della PrP^{Sc} produceva due “*pattern*” molecolari distinguibili. Il trattamento con enzimi proteolitici determinava inoltre, nei due ceppi in esame, una differente degradazione della PrP^{Sc}, implicando che la stessa potesse presentarsi in due diverse conformazioni con un distinto comportamento nei confronti della degradazione enzimatica. Molti altri studi hanno dimostrato che i ceppi prionici possono essere distinti sulla base delle differenti proprietà biochimiche della PrP^{Sc}, permettendo un approccio molecolare alla caratterizzazione delle TSE umane ed animali (Collinge et al., 1996; Parchi et al., 1996; Hill et al., 2006). In particolare, i parametri biochimici su cui si basa tale distinzione sono: **1)** *pattern* di glicosilazione della PrP^{Sc}; **2)** dimensioni e peso molecolare dei frammenti di PrP^{Sc} proteinasi k-resistenti (Nonno et al., 2003). Possedendo due distinti siti di glicosilazione, ogni singola catena polipeptidica della PrP^{Sc} può presentarsi in forma di-glicosilata, mono-glicosilata a livello di uno dei due succitati siti oppure non-glicosilata (Di Guardo, 2015). La stessa PrP^{Sc} ha la caratteristica di essere parzialmente resistente alla digestione proteolitica con proteinasi K (PK), ragion per cui una porzione verrebbe “clivata” mentre quella residua risulterebbe resistente (PrP^{res}). L'analisi elettroforetica della PrP^{Sc} a seguito di trattamento con PK mette quindi in evidenza tre bande proteiche, corrispondenti alle forme di-, mono- e non glicosilate della proteina. Il rapporto tra le suddette forme di PrP^{Sc} (“glicotipo”) varia a seconda del ceppo in questione (Nonno et al., 2003; Di Guardo, 2015).

Al fine conciliare l'esistenza, in natura, di molteplici ceppi di agente delle TSE in assenza di acido nucleico (Safar et al., 2005b), gli aggregati di PrP^{Sc} sarebbero in grado di codificare e trasmettere le informazioni insite in distinte proprietà biologiche all'interno della stessa sequenza aminoacidica, mentre la PrP^C sarebbe in grado di acquisire fedelmente queste informazioni durante la sua conversione in PrP^{Sc} (Bessen & Marsh, 1994; Telling et al., 1996). Secondo il succitato modello la PrP^{Sc} agirebbe da stampo nella replicazione delle nascenti molecole di PrP^{Sc}. In accordo con tali presupposti, i diversi ceppi devono essere pertanto capaci di mantenere le diverse proprietà iscritte nella PrP^{Sc} e queste differenze a livello molecolare dovrebbero quindi tradursi nelle distinte peculiarità proprie di ciascun ceppo (Parchi et al., 1996; Telling et al., 1996; Nonno et al.,

2006;). I prioni sarebbero dunque in grado di “ricapitolare” le loro proprietà ceppo-specifiche nella struttura terziaria e/o quaternaria della PrP^{Sc} (Nonno et al., 2003, 2006; Di Guardo, 2015).

È stato altresì dimostrato che la stabilità conformazionale della PrP^{Sc} in presenza di agenti denaturanti caotropici, quali la guanidina o l'urea, varia enormemente tra diversi ceppi (Peretz et al., 2001). Utilizzando questa metodica denominata *Conformational Stability Assay* (CSA), è stato possibile monitorare variazioni della stabilità proteica associata a cambiamenti del fenotipo del ceppo dopo trasmissione in adeguati modelli sperimentali (Peretz et al., 2002).

In alcuni casi, le differenze nel profilo immunobiochimico sono ben evidenti e utili per la caratterizzazione dei ceppi (Prusiner, 1998; Aguzzi & Heppner, 2000; Aguzzi & Polymenidou, 2004), come è avvenuto, ad esempio, a proposito della distinzione tra l'agente della sCJD e quello della vCJD (Collinge et al., 1996). In altri casi la distinzione tra i vari ceppi risulterebbe più difficoltosa e deve prendere in considerazione una serie di variabili.

In alternativa, le suddette proprietà potrebbero anche risiedere nelle differenti conformazioni spaziali che la PrP^{Sc} può assumere (Aguzzi et al., 2007). A tal proposito, meritano grande attenzione i risultati degli studi prodotti da Christina Sigurdson et al. (2007), i quali hanno proposto di caratterizzare i ceppi attraverso l'impiego di “polimeri luminescenti” in grado legarsi alla PrP^{Sc} emettendo radiazioni luminose a diversa lunghezza d'onda a seconda della conformazione tridimensionale che assumono.

La possibilità di distinguere i diversi ceppi di agente delle TSE si è concretizzata anche grazie ai traguardi scientifici raggiunti negli ultimi anni. A tal proposito, i sensibili progressi registrati nel campo delle indagini immunobiochimiche basate sull'impiego della tecnica del *Western Blotting* (WB) hanno dato un notevole contributo nella discriminazione tra i diversi ceppi. Il WB, infatti, è stato impiegato per calcolare i differenti rapporti quantitativi fra le 3 bande che compongono la PrP^{Sc} (Yokoyama et al., 2008). Xanthopoulos et al. (2009) hanno invece dimostrato che, oltre alle già documentate differenze nella mobilità elettroforetica al WB, sarebbe possibile differenziare i vari ceppi

utilizzando la lecitina, una proteina legante lo zucchero, discriminando quindi i ceppi di TSE in base alle caratteristiche degli zuccheri legati alla molecola della PrP^{Sc}. Un ulteriore studio condotto nel 2011 sottolinea altresì la possibilità di discriminare alcuni ceppi di Scrapie classica (CH1641 e CH1641-like), atipica (Nor98) e BSE (sperimentalmente indotta) su base molecolare nei piccoli ruminanti. In questo studio è stato sviluppato un nuovo saggio di stabilità conformazionale basato sulla solubilità differenziale di PrP^C e PrP^{Sc}, denominato *Conformational Stability and Solubility Assay* (CSSA). Più in particolare, il lavoro anzidetto riporta la messa a punto di un WB più discriminante, basato sulla denaturazione con GdnHcl e sull'utilizzo di anticorpi monoclonali, in maniera tale da differenziare i ceppi CH1641 e CH1641-like dal ceppo Nor98 e da quello responsabile della BSE nella pecora e nella capra (Pirisinu et al., 2011).

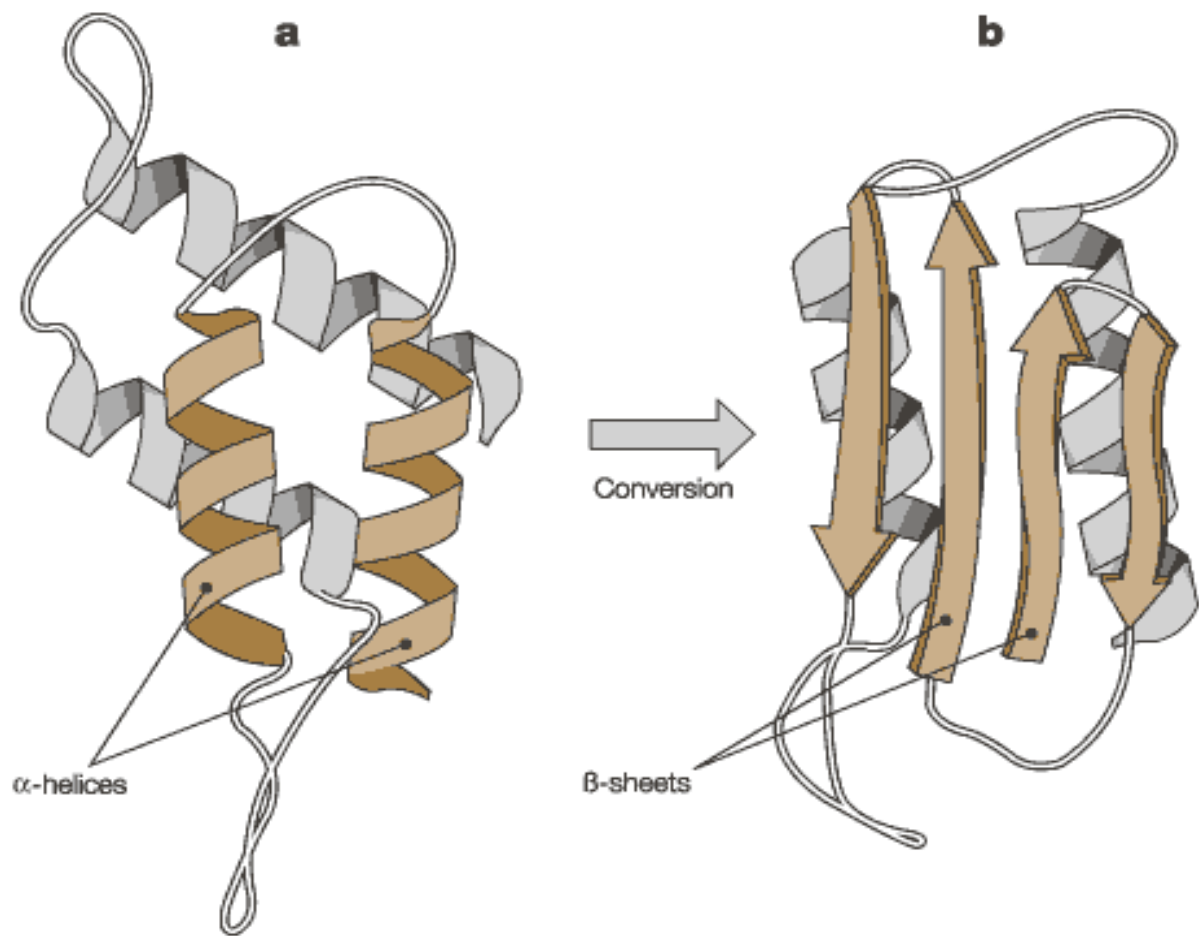
Negli ultimi anni lo sviluppo di *test* innovativi *in vitro* ha permesso di ampliare gli orizzonti riguardanti la caratterizzazione dei ceppi di TSE, in quanto più rapidi e convenienti dal punto di vista economico rispetto alle prove biologiche su animali da laboratorio. Questo approccio è basato sulla scelta di cloni cellulari in grado di sostenere la replicazione specifica di alcuni ceppi (Mahal et al., 2008). A tal proposito, inoltre, studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che la reattività dei fattori del complemento differirebbe al variare del ceppo in questione (Hasabe et al., 2012). La possibilità di ottenere la replicazione prionica su colture cellulari si è materializzata nel 2008 in uno studio in cui i prioni dell'arvicola e del topo sono stati replicati su cellule renali di coniglio (RK 13) modificate geneticamente mediante l'inserimento al loro interno del gene *PRNP* di una specie (Courageot et al., 2008).

Infine, la tecnica PMCA (*Protein Misfolding Cycling Amplification*) è una metodica molto promettente che permette di riprodurre *in vitro* diversi aspetti della biologia dei prioni, offrendo un modello adatto per lo studio di nuove generazioni di prioni mediante cicli di amplificazione della PrP^{Sc} presente. Questa tecnica ha permesso di dimostrare come l'infettività prionica possa essere replicata *in vitro* mantenendo nella nuova generazione di prioni le proprietà strutturali, biochimiche e biologiche di quelli di origine, insieme alla capacità di infettare animali recettivi (Castilla et al., 2008). Il limite di questa metodica è però quello di generare falsi positivi legati alla comparsa di PrP^{Sc} in seguito ad eventi di

cross-contaminazione in alcune fasi delicate quali, ad esempio, fasi sonicazione e d'incubazione. Da ciò deriva che questa tecnica richiede l'utilizzo di condizioni sperimentali strettamente controllate e la giusta cautela nell'interpretazione dei risultati ottenuti (Cosseddu et al., 2011).

Fig. n. 1 Conformazione spaziale della PrP^C e della PrP^{Sc}.

La PrP^C (immagine a) ha una conformazione prevalentemente ad α -elica, diversamente dalla PrP^{Sc} (immagine b), la cui struttura secondaria è prevalentemente a β -foglietti. (tratto da www.rete-dida.it/dida/bio/prioni/soddu.htm)



Source: *Prion Biology and Diseases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999

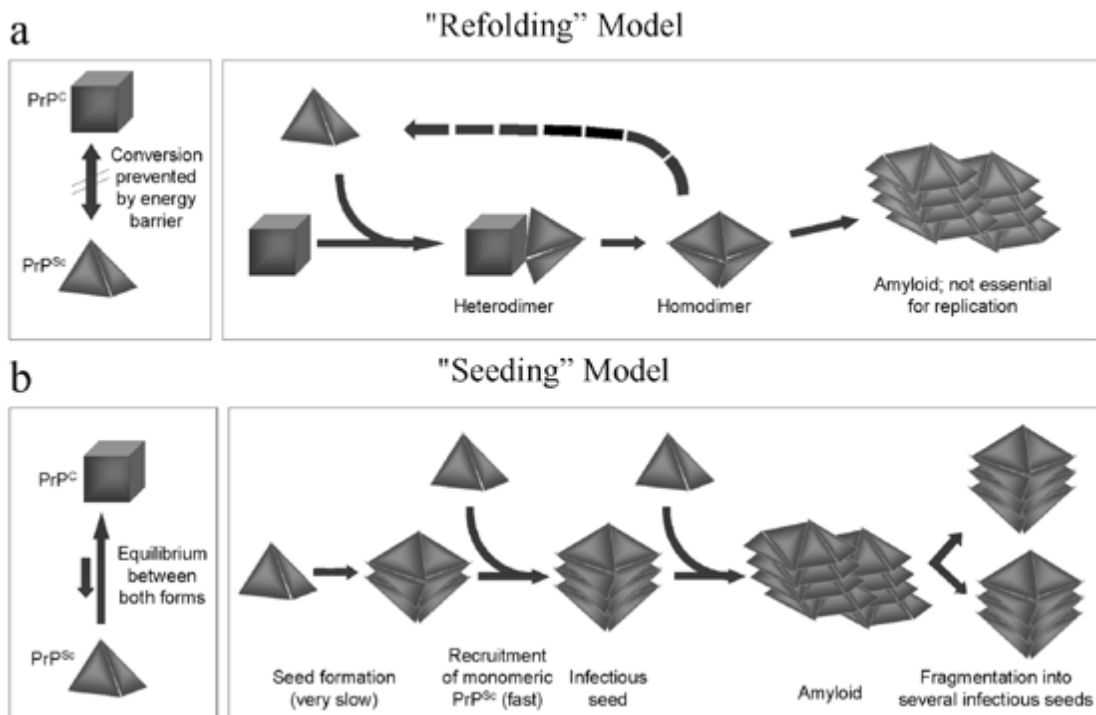


Fig. n. 2: Modelli di conversione conformazionale della PrP^C in PrP^{Sc}. Il primo modello (a), **“template-directed refolding model”**, postula l’interazione fra molecole esogene di PrP^{Sc} e molecole endogene di PrP^C. Tale interazione indurrebbe la conversione della PrP^C in PrP^{Sc}. Un’eventuale conversione spontanea sarebbe impedita da una consistente “barriera energetica”. Nel secondo modello (b), **“seeded nucleation”** o **“nucleation polymerization model”**, si ipotizza che PrP^C e PrP^{Sc} siano in equilibrio termodinamico reversibile. Se numerose molecole di PrP^{Sc} si dispongono a formare una struttura altamente ordinata, altre molecole di PrP^{Sc} possono essere ulteriormente reclutate con eventuale formazione di depositi di sostanza amiloide. La struttura simil-cristallina di questi aggregati rende la PrP^{Sc} estremamente stabile. La frammentazione (“*seed*”) di questi aggregati determina un aumento del numero dei nuclei di sedimentazione, i quali possono reclutare a loro volta altre molecole di PrP^{Sc} avviando una sorta di processo di polimerizzazione con apparente “replicazione” dell’agente (Aguzzi & Heppner, 2000).

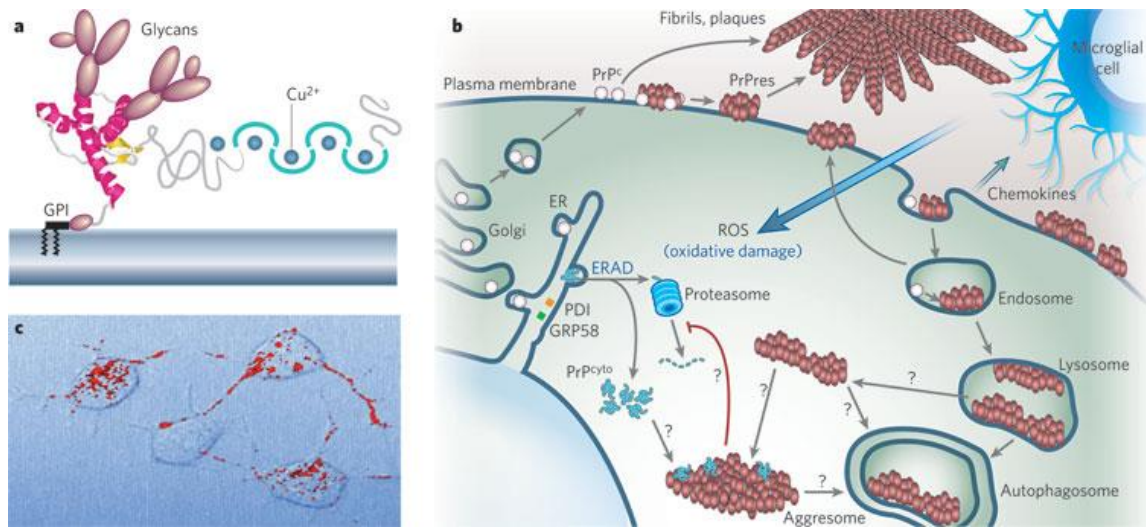


Fig. n. 3: Modello di conversione conformazionale della PrP^C in PrP^{Sc}. L'immagine **a**) mostra la PrP^C legata ai fosfolipidi della membrana cellulare attraverso un'"ancora" glicosil-fosfatidil-inositolica (GPI-*anchor*). L'immagine **b**) mostra che il momento saliente della conversione della PrP^C in PrP^{Sc} si realizzerebbe a seguito del contatto tra le due isoforme sulla superficie cellulare e/o all'interno di endosomi che "sequestrano" gli aggregati proteici presenti a livello della membrana cellulare. Sembra inoltre che la conversione di PrP^C priva della suddetta "ancora" possa portare al deposito extracellulare di sostanza amiloide. L'immagine **c**) mostra colture cellulari neuronali infettate sperimentalmente con PrP^{Sc} legata ad una molecola fluorescente. A seguito dell'infezione le cellule hanno assunto la PrP^{Sc}, contenuta all'interno di apposite vescicole (Caughey & Baron, 2006).

1.1.3 La proteina prionica cellulare (PrP^C)

Gli studi condotti nel corso degli anni hanno rivelato che la PrP^C assume un ruolo fondamentale nell'eziopatogenesi delle TSE. Ciò ha spinto molti ricercatori ad acquisire ancora maggiori informazioni su questa molecola proteica, cercando di comprenderne l'esatto ruolo fisiologico, al fine di eliminare i dubbi che ad oggi riguardano i processi post-traslazionali, a cui fa seguito l'accumulo di PrP^{Sc}.

La PrP^C è una sialoglicoproteina del peso molecolare di 30-35 KDa, costituita da 256 aminoacidi (nella specie ovina), provvista di un ancoraggio di glicosil-fosfatidil-inositolo ("GPI-*anchor*") attraverso il quale si lega ai fosfolipidi delle membrane cellulari e che contiene due distinti siti di glicosilazione (Asn/Glu nelle posizioni 181 e 197) ed è presente nelle cellule in 3 diverse glicoforme ("glicotipi"), rispettivamente di- mono e non-glicosilate (Goldmann, 2008; Yokoyama et al., 2008).

La PrP^C viene sintetizzata a seguito della trascrizione e successiva traduzione dell'informazione presente nel gene *PRNP* dell'ospite (Prusiner, 1998). La sequenza aminoacidica che definisce la struttura primaria di tale proteina, codificata dal suddetto gene varia, ovviamente, in relazione alla specie animale in questione (Di Guardo, 2015).

La via biosintetica seguita dalla PrP^C è simile a quella di altre proteine di membrana secrete, coinvolgendo il reticolo endoplasmatico (RE), a livello del quale la sequenza aminoacidica primaria viene assemblata grazie a strutture ribosomiali, con il successivo transito attraverso l'apparato del Golgi, ove la proteina subisce un processo di "maturazione" attraverso modifiche post-traslazionali, e la sua espressione finale sulla membrana plasmatica cellulare (Westergard et al., 2007). Al pari di altre proteine ancorate alla superficie cellulare tramite GPI, la PrP^C risiede su certi "microdomini di membrana" ("*membranous microdomains*", MM) ricchi in colesterolo e denominati "*rafts*", interagendo fortemente, a tale livello, con componenti quali il distroglicano, l'enzima "ossido nitrico sintetasi" ("*nitric oxide synthase*", NOS) ed i recettori per il complemento (CD21/35) e per la laminina (37-kDa/67-kDa LRP/LR). Quest'ultima interazione, in particolare, può essere sia di tipo diretto, sia mediata dal legame della PrP^C con un

proteoglicano (eparan-solfato-proteoglicano), che si complesserebbe a sua volta con la proteina attraverso due distinti siti di legame (Di Guardo, 2015). Sebbene la PrP^C risulti particolarmente abbondante a livello della membrana plasmatica legata ai “rafts” lipidici, una quota di tale proteina sarebbe riscontrabile all’interno di canali rivestiti di clatrina, attraverso i quali subirebbe un processo di endocitosi. Da qui può essere nuovamente riportata sulla superficie cellulare tramite specifiche proteine di trasporto e quindi riciclata, oppure può essere indirizzata all’interno dei lisosomi per la definitiva degradazione (Westergard et al., 2007).

L’impiego della spettroscopia in risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) ha permesso di studiare approfonditamente la struttura definitiva della PrP^C dal punto di vista molecolare. Nelle diverse specie animali considerate, quali topo, uomo, criceto, ruminanti selvatici (cervo ed alce) e domestici (bovini, ovini e caprini), è stato osservato che questa proteina appare costituita da due domini non esattamente correlati tra loro; il dominio N-terminale (residui 23-128), e il dominio C-terminale (residui 123-231) che comprende, a sua volta, tre catene ad α -elica, rispettivamente $\alpha 1$ (residui 144-154), $\alpha 2$ (residui 179-193) e $\alpha 3$ (residui 200-217), nonché due catene anti-parallele a β -foglietto, $\beta 1$ (residui 128-231) e $\beta 2$ (residui 161-164), che si localizzano accanto alla prima α -elica (Baral et al., 2015) (Fig. n. 4).

La seconda e la terza α -elica sono connesse da un ponte disolfuro (S-S) di circa 35 aminoacidi compreso tra i residui Cys 179 e Cys 214 (Riek et al., 1996), così come la seconda catena a β -foglietti e la seconda α -elica lo sono per mezzo di un’ansa (*loop*) (Gossert et al., 2005). Questo *loop* (residui aminoacidici 166-175), particolarmente flessibile nella maggior parte delle specie animali, risulta invece rigido nei cervidi, un dato che spiegherebbe la loro elevata suscettibilità nei confronti della CWD (Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Sigurdson et al., 2008; Di Guardo, 2015). Inoltre, la conformazione e la composizione in aminoacidi del suddetto *loop* potrebbero avere un ruolo determinante nella costituzione della “barriera di specie” o “barriera di trasmissione”, come testimoniato da recenti studi effettuati soprattutto nella specie murina (Avbelj et al., 2011).

L'estremità N-terminale della PrP^C sembra invece poco strutturata, con una morfologia a “coda flessibile”, sebbene contenga due regioni conservate ben definite. La prima è formata da un octapeptide ripetuto per 5-11 volte; questa regione sembra essere importante nel legame con gli ioni rame (Cu^{++}) e potrebbe essere coinvolta nella patogenesi delle malattie da prioni. La seconda, a valle rispetto alla prima regione, contiene un profilo altamente idrofobico e conservato, che era stato originariamente chiamato “regione trans-membranaria”. Tuttavia, poiché non è noto se questo dominio davvero funzioni come regione trans-membranaria in condizioni fisiologiche, attualmente è stato più propriamente definito “*core idrofobico*” (Aguzzi & Heikenwalder, 2006). L'estremità C-terminale presenta, a sua volta, una morfologia simile alle proteine globulari, risultando stabilizzata, come già anticipato, da un ponte disolfuro che lega la seconda e la terza α -elica. Questo dominio è stato oggetto di studio per diversi motivi, in particolare sia perché è risultato letale se espresso in topi transgenici (Prusiner, 1998), sia perché contiene la maggior parte dei siti in cui si verificano mutazioni puntiformi collegate alla comparsa, nelle TSE umane, di forme familiari. La NMR ha dimostrato che queste mutazioni si verificherebbero all'interno di questa regione molecolare, oppure in siti direttamente adiacenti. Infine, la presenza dei β -foglietti all'interno di questo dominio era in contrasto con i modelli strutturali previsti fino ad allora, che si basavano su un modello totalmente ad α -elica della PrP^C e ciò poteva essere importante per l'avvio della trasformazione della PrP^C nella sua isoforma patologica, la PrP^{Sc} (Riek et al., 1996).

L'espressione della PrP^C ha inizio nella vita embrionale, ma raggiunge il suo massimo livello in età adulta. Negli adulti, alti livelli si rinvenivano nel SNC (prevalentemente sulla membrana dei neuroni e degli astrociti), nonché in organi e tessuti linfoidi secondari. In questi ultimi la PrP^C risulta particolarmente espressa dalle cellule follicolari dendritiche (*Follicular Dendritic Cells*, FDCs), con più marcati livelli di espressione documentati in animali di giovane età (Marruchella et al., 2012). Negli altri tessuti periferici un evidente *pattern* di espressione della PrP^C è stato evidenziato in linfociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali e in cellule progenitrici della linea eritroide, mentre milza, linfonodi, polmone, miocardio, rene, muscolatura scheletrica, utero, ghiandole surrenali e paratiroidi, prestomaci e abomaso, intestino e ghiandola mammaria costituirebbero ulteriori distretti

siti in cui è stata osservata una più o meno elevata espressione della PrP^C (Horiuchi et al., 1995; Aguzzi & Polymenidou, 2004; Cazaubon et al., 2007).

Le funzioni biologiche della PrP^C rimangono tuttora in buona parte oscure. I numerosi esperimenti effettuati su modelli murini transgenici, cioè privati del gene *PRNP* (*Prnp*^{-/-}), hanno dimostrato che la mancata espressione della PrP^C da parte dell'ospite non consente né la replicazione dell'agente né la comparsa e la successiva evoluzione della malattia (Bueler et al., 1992; 1993; Brandner et al., 1996; Sakaguchi et al., 1996). La presenza della PrP^C sarebbe pertanto da considerarsi un prerequisito indispensabile nella patogenesi delle TSE (Prusiner et al., 1990; Bueler et al., 1992; Prusiner, 1998). D'altro canto, l'iper-espressione della PrP^C a livello di SNC sarebbe in grado di ridurre notevolmente il periodo di incubazione nell'infezione sperimentale (Scott et al., 1989; Fischer et al., 1996).

Dal punto di vista biologico-funzionale la PrP^C è una metallo-proteina in grado di legarsi con affinità differenti a vari tipi di metalli pesanti. Si lega infatti, con un elevato grado di affinità, a ioni quali rame (Cu^{++}) e zinco (Zn^{++}), e, seppur con minore affinità a manganese (Mn^{++}) e nichel (Ni^{++}). Il legame con il rame avverrebbe mediante il coinvolgimento dell'aminoacido istidina, localizzato all'interno della regione octapeptidica (*Octarepeat region*) del dominio N-terminale, anche se studi recenti hanno rivelato la presenza di altri siti leganti il rame (Di Guardo, 2015). Poiché il dominio N-terminale è anche coinvolto nel legame della PrP^C con un certo numero di ligandi proteici, è stato ipotizzato che il rame possa giocare un ruolo strutturale e influenzare il legame della PrP^C a queste altre proteine. A sostegno del possibile ruolo fisiologico della PrP^C nel regolare l'omeostasi del rame, è stato dimostrato che topi transgenici (*Prnp*^{-/-}) mostrano una concentrazione di rame del 50% inferiore all'interno di frazioni sinaptosomali rispetto a topi "wild type". Questo suggerisce che la PrP^C potrebbe essere coinvolta nella regolazione delle concentrazioni di rame nella regione sinaptica dei neuroni, ad esempio giocando un ruolo nell'"uptake" del rame nelle fibre presinaptiche. Inoltre è stato dimostrato che l'endocitosi della PrP^C, attraverso vescicole rivestite di clatrina, è stimolata quando il rame viene aggiunto a colture cellulari di neuroblastoma, suggerendo che questa internalizzazione potrebbe essere coinvolta nel trasporto del rame dal compartimento extracellulare a quello intracellulare (Atkinson et al., 2015).

È stato altresì ipotizzato che la PrP^C possa sequestrare gli ioni rame in sede extracellulare e trasportarli all'interno della cellula mediante il proprio dominio transmembranario per poi "presentarli", attraverso il proprio dominio intracellulare, ad apposite proteine citoplasmatiche, proteggendo così i neuroni dalla tossicità del rame libero (Brown 2001). Qin et al. (2009) hanno riportato che in cellule murine neuro-2a e in cellule umane HeLa elevati livelli di rame indurrebbero una sovraespressione della PrP^C; il significato di ciò sarebbe da ricercare nella protezione, da parte della stessa PrP^C, della cellula nei confronti dello stress ossidativo, giocando un ruolo nella modulazione della concentrazione del rame intracellulare. Infine, è stato recentemente dimostrato che le cellule capaci di esprimere maggiori livelli di PrP^C sarebbero più resistenti al sovraccarico cronico da metalli pesanti quali rame, zinco, manganese e nichel e quindi anche più resistenti nei confronti dello stress ossidativo indotto dagli stessi, rispetto alle controparti cellulari che esprimono poco o affatto la PrP^C (Prcina et al., 2015). Ciò troverebbe il suo fondamento, seppur in parte, nell'alterata omeostasi del glutatione (GSH), uno dei principali regolatori dello stato "redox" cellulare e contribuirebbe altresì a spiegare l'alterata risposta e l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo, da parte dei neuroni, in corso di TSE (Landini & Di Guardo, 2013).

La localizzazione della PrP^C sulla membrana citoplasmatica ha permesso di ipotizzare il coinvolgimento di tale proteina in funzioni di adesione inter-cellulare, nel mantenimento della plasticità sinaptica (Maglio et al., 2004; Steele et al 2007), nonché in fenomeni di trasduzione di segnali cellulari (Mouillet-Richard et al., 2000) e di differenziazione e proliferazione cellulare. Ad esempio, alcuni Autori hanno dimostrato il legame funzionale della PrP^C con l'enzima fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI-3K), una protein-chinasi coinvolta nella sopravvivenza cellulare (Jeffrey & Gonzales, 2007), mentre altri studi, effettuati sia *in vitro* (linee cellulari) che in vivo (topo), hanno dimostrato che le cellule che esprimono la PrP^C posseggono livelli di PI-3K più elevati rispetto alle stesse cellule che esprimono bassi livelli di PrP^C (Vassallo et al., 2005). Inoltre, la PrP^C ha mostrato la capacità di trasdurre segnali cellulari neuroprotettivi attraverso l'attivazione di protein-chinasi A AMP ciclico-dipendenti (cAMP-PKA) quali, la tirosina protein-chinasi Fyn (FYN) e molte altre (Chiarini et al., 2002).

Recentemente è stato riportato che la PrP^C possa giocare un ruolo nello sviluppo, nell'attivazione e nella proliferazione dei linfociti T (Mattei et al., 2004) e, sebbene ne sia stato ampiamente dimostrato l'elevato livello di espressione in cellule del sistema immunitario, quali le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DCs), così come in monociti, piastrine, cellule natural killer (*Natural Killer Cells*, NKCs), linfociti B e linfociti T, la stessa subirebbe una “*up-regulation*” durante l'attivazione dei linfociti della linea T e, ancora di più, durante la differenziazione delle cellule NKCs (Martinez et al., 2006). Come noto, le FDCs mostrano elevati livelli di espressione della PrP^C, tuttavia è stato dimostrato che topi con FDCs private di PrP^C (*PrP^C^{-/-}*) non hanno presentato alcuna alterazione nella maturazione o nella funzionalità di tali cellule indicando pertanto che elevati livelli di espressione della proteina non sarebbero essenziali in questo contesto (McCulloch et al., 2013). D'altro canto, è stato dimostrato che la PrP^C svolgerebbe un ruolo importante nella fagocitosi. In particolare, i macrofagi PrP^C^{-/-} hanno un'attività fagocitaria più elevata sia *in vivo* che *in vitro*. Pertanto, la PrP^C regolerebbe negativamente la fagocitosi. A sostegno di ciò, diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che gli animali *Prnp^{-/-}* sarebbero più resistenti alle infezioni sperimentali sostenute da *Brucella abortus* (Aguzzi & Hardt, 2003) da *Mycobacterium bovis* e da ceppi neurotropi di *Herpes Simplex Virus* (HSV). Al contrario, topi transgenici iper-esprimenti la PrP^C (Topi Tga 20) risulterebbero altamente suscettibili nei confronti dell'infezione da HSV (Thackray & Bujdoso, 2002). Tutto questo potrebbe essere correlato al fatto che i macrofagi mostrano fisiologicamente livelli di PrP^C estremamente bassi e solitamente inferiori ai limiti di rilevamento (De Almeida et al., 2005).

Molto interessanti appaiono i risultati di lavori svolti da diversi gruppi di ricerca sulla possibile attività citoprotettiva esplicata dalla PrP^C, in particolare nei confronti di quei fattori interni e ambientali che inducono la cellula ad avviare il programma apoptotico. Gli studi condotti *in vivo* hanno infatti dimostrato che l'assenza della PrP^C nei neuroni dell'ippocampo indurrebbe la morte cellulare programmata negli stessi (Kuwahara et al., 1999, Roucou et al., 2004). Uno degli esempi più illuminanti in un siffatto contesto sarebbe la documentata capacità della proteina di proteggere i neuroni fetali umani in coltura contro l'apoptosi indotta dall'anti-oncogene *Bax*. Quando queste cellule sono state

inoculate con un plasmide codificante per il *Bax*, circa il 90% di esse sono andate incontro ad apoptosi; al contrario quando i neuroni sono stati inoculati sia con plasmidi codificanti per *Bax*, sia con plasmidi codificanti per PrP^C, la percentuale di cellule apoptotiche era ridotta a circa il 10% (Bounhar et al., 2001; Roucou et al., 2003). Nuove informazioni in tal senso ci sono pervenute da uno studio di Laroche-Pierre et al (2009), i quali hanno dimostrato con successo che la terza α -elica della PrP^C sarebbe indispensabile per lo svolgimento di una specifica funzione anti-*Bax*, quindi anti-apoptotica. I meccanismi biochimici attraverso i quali la PrP^C proteggerebbe la cellula, inibendone, di fatto, il processo apoptotico, sono molteplici e si basano tutti sulla corretta conoscenza del gene *Bax*. In primo luogo, il “GPI-*anchor*” della PrP^C potrebbe interagire con un recettore transmembranario, avviando così una cascata di trasduzione del segnale. Questa cascata potrebbe quindi alterare l'attività di *Bax* direttamente, per esempio inibendo la sua traSLOscazione mitocondriale o inducendone un cambiamento conformazionale (Fig. n. 5A). Questi stessi effetti potrebbero anche essere il risultato di una interazione fisica tra *Bax* e “diverse” forme citoplasmatiche di PrP^C (Fig. n. 5B). In alternativa, un segnale PrP^C-dipendente potrebbe agire a monte di *Bax*, causando sia l'inibizione di mediatori pro-apoptotici come *BH3* che attivano il gene *Bax* (Fig. n. 5C) sia una maggior associazione di *Bax* con i regolatori anti-apoptotici, quali *Bcl-2* o *Bcl-XL* (Fig. n. 5D). Un'altra possibilità è che la PrP^C agisca a valle di *Bax* sopprimendo il rilascio di fattori in grado di innescare l'apoptosi, quali il citocromo C, APAF-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) e caspasi (Fig. n. 5E). Infine, la PrP^C potrebbe anche interferire nel rilascio di ioni calcio (Ca^{++}), indotto da *Bax*, dal reticolo endoplasmatico, legandosi presumibilmente ad un recettore di membrana (Fig. n. 5F) (Westergard et al., 2007). Ulteriori studi condotti su topi transgenici hanno permesso di identificare un nuovo gene, denominato *PRND*, e codificante, a sua volta, per una proteina simil-prionica denominata *Doppel* (Dpl) e già prodotta nel corso della vita embrionale, ma i cui livelli di espressione a livello di SNC sarebbero, al contrario della PrP^C, estremamente ridotti (Moore et al., 1998). Livelli di espressione dell'mRNA di Dpl d'entità ben più marcata sarebbero invece presenti a livello di testicolo, cuore e, in minor misura, a livello di milza, ovaio, muscolatura scheletrica e, limitatamente alla prima settimana di vita nel topo, anche a livello degli endoteli vasali del SNC, della mucosa intestinale e della milza, informazione quest'ultima da cui discende

peraltro l'ipotesi che la proteina Dpl sia coinvolta nella maturazione della barriera ematoencefalica. Tale proteina, strutturalmente, funzionalmente e biologicamente correlata alla PrP^C, risulta costituita nella specie murina da 179 aminoacidi ed è codificata da un gene (*Prnd*) localizzato sullo stesso cromosoma in cui risiede il gene codificante per la PrP^C, ad una distanza compresa fra 12 e 21 kb a seconda della specie animale in causa. Recenti studi hanno consentito di identificare, a livello del gene *Prnd* ovino e bovino, la presenza di due esoni (a differenza dei corrispondenti geni dell'uomo e del topo, che ne conterebbero tre), nonché di caratterizzare una serie di polimorfismi "non silenti" (in posizione 50, 110 e 132) a livello della regione codificante del gene bovino, ma non di quello ovino (in cui sono state descritte solo due sostituzioni "silenti" in posizione 12 e 26), senza che sia stata peraltro stabilita alcuna significativa correlazione fra presenza dei suddetti polimorfismi, da un lato, ed accresciuta o ridotta suscettibilità alle TSE nelle due specie in oggetto, dall'altro (Comincini et al., 2001; Ubaldi et al., 2005; Steele et al., 2007; Di Guardo, 2015). Alcuni studiosi hanno avanzato l'ipotesi che la proteina Dpl possa esplicare, al contrario della PrP^C, una funzione pro-apoptotica, teoria quest'ultima avvalorata dal dato secondo cui essa sarebbe in grado, qualora sintetizzata in quantità eccessive, di causare atassia locomotoria, inducendo la comparsa di lesioni neurodegenerative praticamente sovrapponibili a quelle prodotte dalla stessa PrP^{Sc} (Rossi et al., 2001; Steele et al., 2007). Uno studio condotto su topi transgenici ha dimostrato, inoltre, che la proteina Dpl sarebbe in grado di innescare non solo il processo apoptotico, ma anche autofagico (Heitz et al., 2010). Per quanto concerne, infine, i rapporti intercorrenti tra Dpl e PrP^C, Sakaguchi (2008) ha dimostrato che la delezione all'interno della PrP^C dei residui amino-terminali in posizione 23-88 renderebbe inefficace la sua azione inibitrice nei confronti della proteina Dpl, promuovendone, conseguentemente, il suo effetto pro-apoptotico. Inoltre, applicando la stessa delezione in posizione 121 o 134, la PrP^C acquisirebbe un'attività neurotossica simile a quella esplicita dalla proteina Dpl. Tuttavia, negli ultimi anni alcuni ricercatori, utilizzando analisi genetiche ed immunologiche, hanno scoperto che la regolazione della fagocitosi di cellule apoptotiche da parte di macrofagi, precedentemente attribuita alla PrP^C, sarebbe invece controllata da un *locus* collegato con il gene *PRNP* codificante per una α -proteina regolatrice di segnale (*Signal Regulatory Protein α* , SIRPA). Ciò testimonierebbe che la modulazione della

fagocitosi sarebbe stata, in passato, erroneamente attribuita a PrP^C, illustrando al contempo la necessità di approcci futuri e più rigorosi per limitare o eliminare del tutto i margini di errore indotti dalla contiguità funzionale tra geni diversi (Nuvolone et al., 2013; Zeng et al., 2015).

E' stato ampiamente dimostrato che la PrP^C svolge un ruolo neuroprotettivo in corso di lesioni ischemiche cerebrali precoci attraverso meccanismi specifici. Le chinasi regolate da segnali extracellulari (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*, ERK), un importante gruppo di proteine note per esacerbare il danno su base ischemica, sono state introdotte per identificare gli effetti della PrP^C sulla morte cellulare ischemica. In particolare, è stato osservato che in topi transgenici *Prnp*^{-/-}, l' aumento dell'espressione di ERK 1 e ERK 2 rappresenta una risposta precoce al danno cerebrale ischemico (Spudich et al., 2005) e, conseguentemente, è stato evidenziato che in topi sovraespressanti, al contrario la PrP^C, i livelli di attivazione post-ischemica di ERK 1 e ERK 2 risulterebbero diminuiti e, contemporaneamente, le dimensioni delle lesioni infartuali significativamente si ridurrebbero (Weise et al., 2008). Studi elettrofisiologici effettuati *in vivo* su topi *Prnp*^{-/-} hanno, inoltre, evidenziato che la PrP^C influenzerebbe una serie di processi all'interno del SNC. Questi studi hanno dimostrato, in particolare, una serie di anomalie funzionali, in primo luogo con riduzione della trasmissione sinaptica, GABA-mediata, a livello di recettori dell'ippocampo; in secondo luogo, con un'attenuazione del potenziamento a lungo termine, cioè la trasmissione di segnali di lunga durata tra neuroni coinvolti nei processi di apprendimento e di memorizzazione (Steele et al., 2007). Negli ultimi anni risultano sempre più importanti le prove a supporto del ruolo della PrP^C nello sviluppo, la differenziazione e la metastatizzazione di tumori. E stato dimostrato, infatti, che la PrP^C risulta altamente espressa in tumori a carico di numerosi organi tra cui pancreas, stomaco, mammella, prostata e colon-retto, nonché in neoplasie chemio-resistenti della ghiandola mammaria e dello stomaco (Han et al., 2002; Liang et al 2006; Liang et al., 2007). La PrP^C, infine, potrebbe svolgere un potenziale ruolo nella patogenesi di malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer. Le causa della malattia sono molto complesse, ma una delle ipotesi propone che il deposito di placche amiloidi extracellulari (*proteina amiloide β*, Aβ₄₀₋₄₂) potrebbe innescare fenomeni di disfunzione neuronale fino

alla morte cellulare (Burns & Iliffe, 2009). Diversi Autori hanno dimostrato la presenza di un'interazione "ad elevata affinità" tra oligomeri di $A\beta_{40-42}$ e PrP^C. Questa interazione giocherebbe un ruolo importante nella tossicità di $A\beta_{40-42}$ a livello sinaptico, causando danni alle membrane cellulari unitamente al rilascio di vescicole sinaptiche contenenti ioni Ca^{++} e conseguente aumento di questo ione a livello intracellulare (Peters et al., 2015). Inoltre, ad accomunare le TSE con le sindromi neurodegenerative da "misfolding proteico" quali la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington, l'atassia/atrofia spino-cerebellare e molte altre, non interverrebbero soltanto le evidenze a supporto dei comuni denominatori neuro-patogenetici, ma anche le loro caratteristiche cliniche. Il morbo di Alzheimer per esempio, analogamente alle malattie da prioni umane decorrerebbe con una sintomatologia psichiatrica e neuro-comportamentali caratterizzata da depressione ed ansia (Thompson et al., 2014). E' stato ipotizzato che il sistema monoaminergico e, in particolare, quello della serotoninergico, possano svolgere un ruolo cruciale nell'insorgenza dei predetti sintomi ed è stato dimostrato altresì che topi *Prnp*^{-/-} mostrano comportamento aggressivo oltre a disturbi del sonno, rispetto ai topi "Wild Type" (Gadotti et al., 2012). Recentemente, è stato anche documentato che la PrP^C regolerebbe il funzionamento dei sistemi monoaminergici. È stato ipotizzato, a tal proposito, che la progressiva perdita di funzione della PrP^C, nel lungo decorso delle succitate malattie neurodegenerative, possa interferire con i circuiti monoaminergici, con la conseguente comparsa delle manifestazioni neuro-psichiatriche proprie di queste malattie (Beckman et al., 2015).

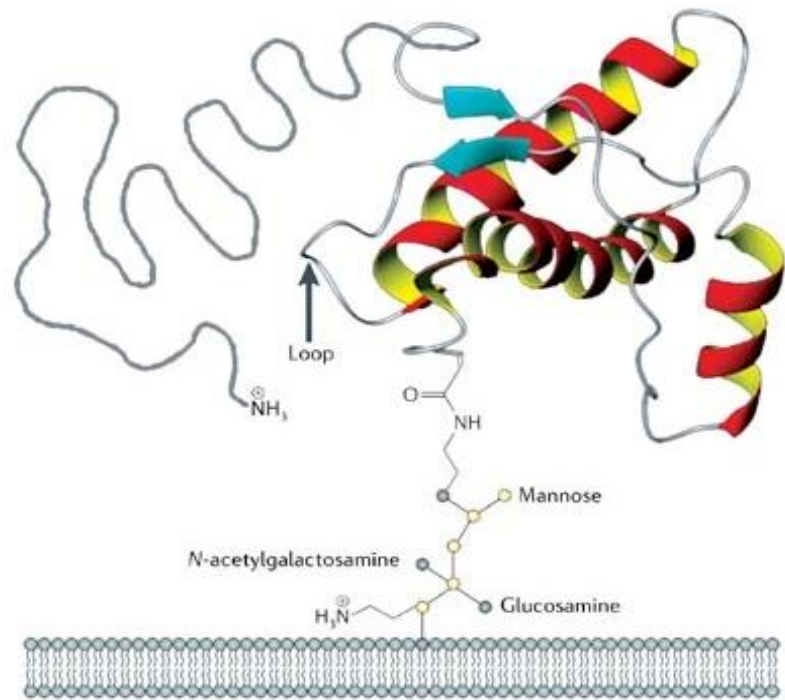


Fig. n.

4:

Struttura terziaria della PrP^C. Il residuo di GPI permette l'ancoraggio della PrP^C al doppio strato fosfolipidico delle membrane plasmatiche. Sono identificabili l'estremità N-terminale della proteina con la relativa morfologia a "coda flessibile", nonché le tre regioni ad α -elica e le due regioni a β -foglietto. La freccia indica il *loop* che connette la seconda regione a β -foglietto alla seconda α -elica (Aguzzi & Heikenwalder, 2006).

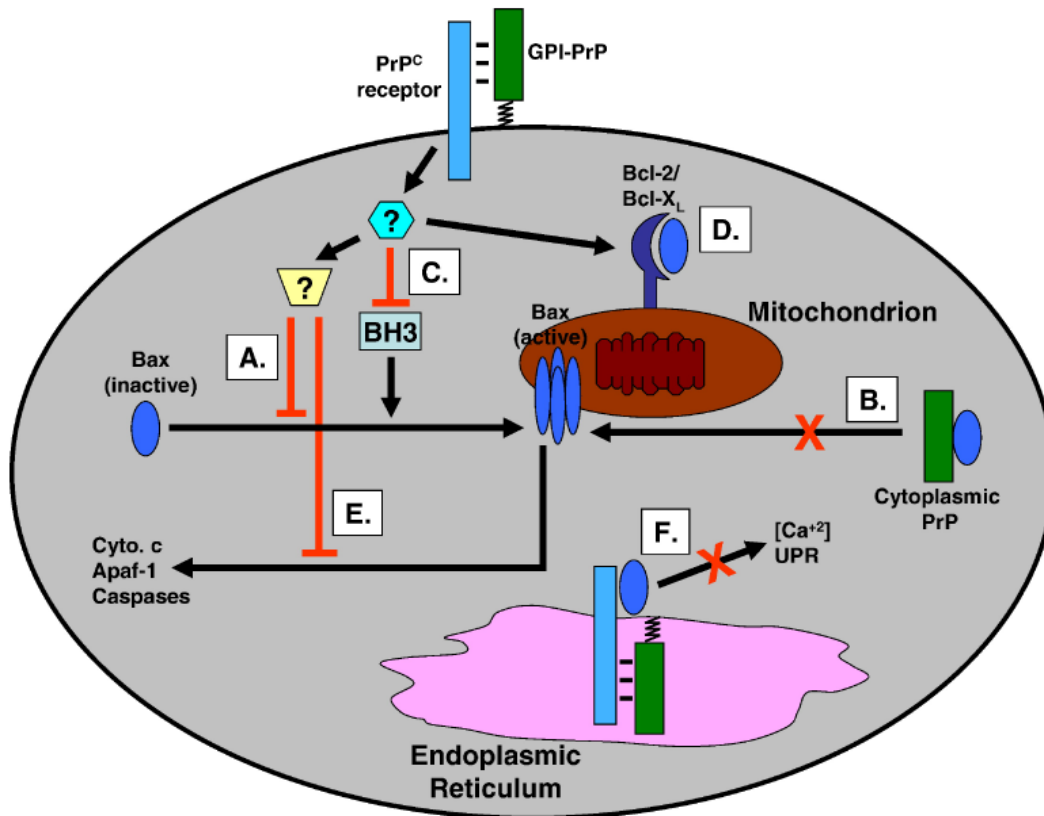


Fig. n. 5: Possibili meccanismi di inibizione dell'apoptosi Bax-indotta ad opera della PrP^C. (A) La "GPI-anchor" della PrP^C potrebbe interagire con un recettore transmembranario specifico, avviando così una cascata di trasduzione del segnale che può alterare l'attività di Bax direttamente, inibendo la sua traslocazione mitocondriale o inducendo altresì un cambiamento conformazionale. (B) Questi stessi effetti potrebbero anche conseguire all'interazione fisica tra Bax e PrP^C in sede citoplasmatica. (C) La PrP^C potrebbe inibire certi mediatori pro-apoptotici quali ad esempio il gene *BH3* in grado di attivare Bax. (D) La PrP^C può migliorare l'associazione di Bax con certi fattori anti-apoptotici, quali *Bcl-2* o *Bcl-XL*. (E) PrP^C potrebbe agire a valle di Bax sopprimendo il rilascio di fattori in grado di innescare l'apoptosi, quali il citocromo C, APAF-1 e caspasi. (F) La PrP^C potrebbe anche interferire sul rilascio, Bax-indotto, di ioni Ca⁺⁺, dal reticolo endoplasmatico, legandosi presumibilmente ad un recettore di membrana (Westergard et al., 2007).

1.1.4 Le basi genetiche della suscettibilità/resistenza alle TSE, con particolare riferimento alla Scrapie ovina.

L'esistenza di fattori genetici dell'ospite in grado di modulare la suscettibilità e la resistenza nei confronti delle TSE è conosciuta oramai da molto tempo. Già nel corso degli anni '60, infatti, Parry riteneva che la Scrapie ovina rientrasse in una "*particolare categoria di malattie genetiche nelle quali l'agente causale sarebbe una piccola particella, dotata di potere patogeno ed in grado di replicare autonomamente, che risentirebbe dell'azione svolta fisiologicamente da un determinato gene dell'ospite*" (Agrimi et al., 2003; Goldmann, 2008).

A tal proposito, è importante ricordare che il fenotipo clinico-patologico che si osserva in presenza di Scrapie come di altre TSE animali ed umane, sia spontanee che sperimentali, costituirebbe il prodotto dell'interazione tra il ceppo di agente responsabile ed il genotipo dell'ospite (Di Guardo, 2015).

Le basi genetiche delle malattie da prioni risiedono nell'esistenza, nel genoma di tutti i vertebrati e di molti altri organismi viventi, compresi quelli zoologicamente meno evoluti, del gene *PRNP* (in passato denominato *Sip*, da *Scrapie incubation period* e *Sinc* da *Scrapie incubation*, rispettivamente nella pecora e nel topo), che codifica per la PrP^C. In alcune specie quali uomo, topo, pecora, capra ed in alcuni cervidi sensibili alla CWD, sono stati identificati numerosi "polimorfismi" genetici in corrispondenza di determinate posizioni della sequenza nucleotidica del gene *PRNP*, in particolare della sua regione biologicamente attiva (*Open Reading frame*, ORF). Il gene *PRNP* è stato mappato sul cromosoma 20 dell'uomo (Sparkes et al., 1986) e sul cromosoma 13 nella specie ovina, caprina e bovina e la sua porzione "funzionale", di lunghezza pari a 21 kb, è formata da tre esoni. Gli esoni I e II hanno dimensioni ridotte e formano l'estremità 5' (non codificante) del trascritto. L'esone III (circa 4 kb) contiene l'intero ORF e codifica per l'estremità 3' del trascritto. L'ORF del gene *PRNP* dei bovini, dei cervidi e degli ovini ha una lunghezza pari a 256 codoni (Goldmann, 2008).

Sono state descritte, in proposito, oltre 40 diverse configurazioni alleliche del gene *PRNP* nella specie ovina (*Ovis aries*) e 22 distinti alleli del medesimo gene nella specie caprina

(*Capra hircus*). In totale, ben 39 dei 256 codoni (15%) si sono dimostrati polimorfici. Alcuni di questi siti polimorfici, tuttavia, è possibile che risiedano nei peptidi di segnale dei domini N-terminale e C-terminale, che subiscono il clivaggio durante la maturazione della PrP^C.

Nella specie ovina, gli alleli del gene *PRNP* vengono convenzionalmente indicati facendo riferimento a tre codoni (136, 154 e 171), i quali sono fondamentali nella modulazione della suscettibilità/resistenza dell'ospite nei confronti sia della Scrapie che della BSE sperimentalmente trasmessa: A136V/T, R154H/L, Q171R/H/K. In ragione di ciò, è possibile pertanto affermare che l'allele ARQ, il quale mostra al codone 136 l'aminoacido alanina (A), al codone 154 l'aminoacido arginina (R) e al codone 171 l'aminoacido glutammina (Q), sarebbe da ritenere l'allele ancestrale. Le combinazioni di questi polimorfismi che si verificano a livello dei tre sopra citati codoni (A136V/T, R154H/L, Q171R/H/L) danno origine a 5 diverse configurazioni alleliche (ARR, ARH, ARQ, AHQ e VRQ), che conferiscono a loro volta vari gradi di suscettibilità/resistenza nei confronti della malattia (Fig. n. 6). L'allele VRQ è quello associato ad una maggiore suscettibilità alla Scrapie, mentre l'allele ARR ad una condizione di spiccata resistenza (Belt et al., 1995; Hunter et al., 1996; Elsen et al., 1999). Sono stati identificati, inoltre, altri polimorfismi in grado di generare tre sequenze alleliche, quali ad esempio, TRQ, ARK, ALQ, i quali però sono molto rari nella popolazione ovina e quindi risulterebbe difficoltoso stabilire il ruolo che potrebbero avere nel determinismo della suscettibilità/resistenza nei confronti della malattia (Acin et al., 2004; Billins et al., 2004; Alvarez et al., 2006). Alcuni studi statistici condotti su larga scala nella popolazione ovina hanno permesso di quantificare il rischio di sviluppare la malattia in associazione a ciascun genotipo mediante la sua misurazione indiretta come *Odds Ratio* (OR). In Gran Bretagna, il cosiddetto tasso di attacco ("*attack rate*"), utilizzato quale parametro di stima della suscettibilità/resistenza genetica, è risultato massimo per il genotipo VRQ/VRQ (545 casi per milione), seguito dai genotipi ARH/VRQ (405 casi per milione), ARQ/VRQ (225 casi per milione), ARQ/ARQ (37 casi per milione) e, infine, ARR/ARR (5 casi per milione) (Detwiler & Baylis, 2003; Baylis et al., 2004; Houston et al., 2015). È da notare, tuttavia, come nella popolazione ovina inglese i genotipi VRQ/VRQ, ARQ/VRQ e

ARH/VRQ abbiano mostrato un “rischio d’infezione” da 20 (nel caso del genotipo VRQ/VRQ) a 50 volte superiore rispetto a quello di riferimento, mentre nella popolazione ovina italiana nessun genotipo ha mostrato un rischio d’infezione superiore a quello del genotipo ARQ/ARQ. Di contro, gli studiosi sono concordi sull’effetto protettivo dei genotipi ARR/ARR, ARR/ARH, AHQ/ARQ e, in generale, di quei genotipi contenenti l’allele ARR. Inoltre, la suscettibilità del genotipo ARQ/ARQ sembra essere massima in quelle razze ovine in cui non sia presente, o sia scarsamente rappresentato, l’allele VRQ (Cosseddu et al., 2007), situazione che caratterizza alcune razze presenti nel bacino del mediterraneo, come la razza Sarda, per le quali i principali “*target*” genetici di Scrapie sono rappresentati dai genotipi ARQ/ARQ e ARQ/AHQ (Vaccari et al., 2001; Agrimi et al., 2003). Ciò sembra dovuto non tanto all’elevata frequenza di questi genotipi nella popolazione ovina, quanto piuttosto ad una effettiva e più consistente suscettibilità degli stessi nei confronti dei ceppi di agente di Scrapie circolanti nel contesto geografico in esame (Di Guardo, 2015). I numerosi studi effettuati in merito alla modulazione della suscettibilità/resistenza alla Scrapie hanno portato il DEFRA (*Department for Environment Food & Rural Affairs*), nel 2001, ad elaborare una classificazione del rischio in base ai suddetti polimorfismi, suddividendo gli ovini in cinque categorie, indicate con la lettera R seguita da un numero progressivo. Secondo tale classificazione, la categoria di rischio più elevata – la R5 – viene riservata agli animali con genotipi VRQ/VRQ, VRQ/ARQ, VRQ/ARH e VRQ/AHQ. È opportuno specificare che il rischio per il genotipo VRQ/AHQ è sorprendentemente più basso, forse per un effetto “protettivo” attribuibile all’allele AHQ. Gli ovini inclusi nel gruppo R4 possiedono un genotipo VRQ/ARR e sono a minor rischio di sviluppare la malattia rispetto agli animali del gruppo R5. Gli ovini appartenenti al gruppo R3 posseggono un genotipo ARQ/ARQ o ARH/ARH; sono animali mediamente resistenti alla Scrapie, ma è necessario tenere in considerazione che ciò è strettamente legato alla razza in questione. Gli ovini del gruppo R2, rappresentato dai genotipi ARR/ARQ, ARR/AHQ e ARR/ARH, sarebbero abbastanza resistenti alla Scrapie, sebbene la loro progenie possa collocarsi in una categoria di rischio superiore. Infine, gli ovini appartenenti al gruppo R1, dotati di genotipo ARR/ARR sono considerati resistenti alla Scrapie classica naturale (Goldmann, 2008). Ciononostante, è importante ricordare che la BSE è stata riprodotta sperimentalmente in animali recanti tale

genotipo (Houston et al., 2003) e, come già accennato, sono stati descritti rari casi di Scrapie in ovini dotati del genotipo resistente ARR/ARR, mentre è stato parimenti dimostrato l'effetto protettivo, nei confronti sia della Scrapie sperimentalmente indotta sia della Scrapie naturale, di alcuni polimorfismi del gene *PRNP* diversi rispetto a quelli presenti a livello dei codoni 136, 154, 171, con specifico riferimento all'allele AF141RQ e, in particolar modo, agli aplotipi AT137RQ e AI142RQ ARQK176 (Maestrale et al., 2009; Vaccari et al., 2009). È inoltre interessante notare che la maggior parte dei casi di Scrapie "atipica" insorgerebbero in animali di categoria R1-R3, e cioè proprio in quegli ovini che mostrano una ridotta sensibilità nei confronti della Scrapie "classica". In effetti, i soggetti con genotipo AHQ/AHQ e AHQ/ARQ sono quelli in cui le forme atipiche di Scrapie tendono a prevalere, mentre l'allele AF141RQ conferirebbe maggior suscettibilità nei confronti della stessa rispetto all'allele AL141RQ (Di Guardo, 2015). Tale classificazione ha subito nel tempo diverse modifiche e revisioni sulla base delle nuove evidenze prodotte, in particolare per quei genotipi considerati meno frequenti nella popolazione ovina e per i quali erano a disposizione scarse informazioni (Tabella n. 2). L'obiettivo era quello di ampliare la comprensione del ruolo svolto dai diversi genotipi nella suscettibilità/resistenza alle TSE, al fine di attuare adeguate misure di controllo nell'ambito del *National Scrapie Plan* (NSP). Tali misure si basano sull'attuazione di un piano di selezione genetica finalizzato al perseguimento dei seguenti obiettivi: 1) Eliminazione dell'allele VRQ dagli allevamenti aderenti al piano; 2) Incremento dell'allele ARR negli allevamenti aderenti al piano; 3) Aumento della disponibilità di montoni con genotipo ARR/ARR; 4) Progressiva diminuzione della frequenza dell'allele ARQ (DM 17/12/2004). Come già anticipato, l'effetto dei diversi polimorfismi del gene *PRNP* è variabile fra le diverse razze ovine. Nella razza *Chevoit*, per esempio, i soggetti omozigoti V136V e gli eterozigoti A136V sono suscettibili al *challenge* con il ceppo SSBP-1 della Scrapie, mentre gli omozigoti A136A risultano resistenti. Nella razza *Suffolk* la presenza dell'allele V136 è molto rara ed i soggetti omozigoti Q171Q presentano la maggior suscettibilità nei confronti della malattia. Da questo punto di vista la razza Sarda si comporterebbe in modo analogo alla razza *Suffolk* (Goldmann et al., 1994; Vaccari et al., 2001; Agrimi et al., 2003). Nella razza Comisana sono stati identificati polimorfismi del gene *PRNP* in corrispondenza dei codoni 112, 136, 154 e 171

ed anche in questo caso è stata dimostrata una correlazione positiva tra il genotipo Q171Q e la suscettibilità alla Scrapie. È stata inoltre osservata sempre in questa razza, la presenza dell'allele V136, analogamente a quanto osservato nella razza Massese in cui il suddetto allele sarebbe presente in percentuale minore (Tabella n. 3) (Agrimi et al., 2003).

Il patrimonio zootecnico ovi-caprino conta in Italia attualmente circa 8,3 milioni di capi ed in tale ambito la Sarda che costituisce, tanto numericamente quanto economicamente, quella più importante. La Regione con maggiore attività pastorizia è la Sardegna, che detiene il 41% del patrimonio ovino nazionale, seguita dalla Sicilia con circa il 12% e dal Lazio con il 10%. L'Abruzzo, pur potendo vantare un'antichissima tradizione pastorizia, attualmente si colloca solo all'ottavo posto tra le Regioni italiane, con 215.642 animali allevati.

La frequenza delle razze facenti parte del nostro patrimonio ovino è rappresentata nella Tabella n. 4, mentre i dati sulla consistenza del patrimonio ovino e caprino in Italia sono illustrati nella Tabella n. 5 e nella Figura. n. 7.

È stata inoltre dimostrata, già da molto tempo, l'esistenza di ulteriori polimorfismi del gene *PRNP* a livello dei codoni 112, 127, 137, 138, 141, 143, 151, 176 e 211; tuttavia, le sostituzioni aminoacidiche a livello di tali codoni risultano meno frequenti e non sembrano influenzare in maniera determinante la suscettibilità e la resistenza nei confronti della Scrapie (Agrimi et al., 2003). Più recentemente, i polimorfismi descritti a livello di altri codoni, con particolare riferimento alla presenza della metionina al posto della treonina o della leucina al posto della fenilalanina rispettivamente ai codoni 112 e 141, hanno mostrato di conferire una maggiore resistenza nei confronti della Scrapie (Laegreid et al., 2008; Gonzalez et al., 2012).

Per quanto concerne la specie caprina, i dati sulla suscettibilità/resistenza alle TSE sono meno numerosi e consolidati rispetto a quelli disponibili per la specie ovina. I codoni 142 e 143 potrebbero modulare, in questa specie, la suscettibilità e la resistenza alla Scrapie, come dimostrato dai risultati ottenuti sia in seguito a prove sperimentali (Goldman et al., 1996), sia in corso di infezione naturale (Billins et al., 2002). Più in particolare, i polimorfismi N146S e N146D sarebbero associati ad una maggior resistenza nei confronti

della Scrapie naturale (Papasavva-Stylianou et al., 2011). Sono stati finora descritti vari polimorfismi nella specie caprina: I142M, H143R, Q222K e P240S. Polimorfismi silenti sono stati inoltre dimostrati a livello dei codoni 42, 138, 219 e 232 (Vaccari et al., 2006; Acutis et al., 2008). In generale, 8 dei 29 polimorfismi del gene *PRNP* descritti nella capra hanno una distribuzione “cosmopolita” (P240, R143, S127, H154, K222, Q211, M142, S146) ed almeno 5 di essi sarebbero in grado di modulare la suscettibilità dell’ospite nei confronti delle TSE (Vaccari et al., 2006; Di Guardo, 2015).

Nella specie bovina, al contrario, i polimorfismi del gene *PRNP* non risulterebbero correlati alla suscettibilità e/o alla resistenza nei confronti della BSE (Goldmann, 2008). È importante però sottolineare, a questo proposito, che i polimorfismi che riguardano i codoni M112T e L141F sarebbero in grado, rispettivamente, di conferire maggior resistenza nei confronti della BSE in ovini britannici (Saunders et al., 2009), aumentandone al contempo la suscettibilità nei confronti della Scrapie atipica (Moum et al., 2005).

Per quanto riguarda la suscettibilità genetica dei cervidi nei confronti della CWD, gli studi sono tuttora in corso e potrebbero fornire una serie di dati importanti per il controllo della malattia, almeno negli Stati Uniti. Come dimostrato in altre specie sensibili alle TSE, infatti, la suscettibilità alla CWD dipende in larga misura dai polimorfismi presenti a carico del gene *PRNP*. A tal proposito, nel cervo mulo, i polimorfismi presenti a livello del codone 225, codificante per la serina o la fenilalanina, influenzerebbero la suscettibilità nei confronti della CWD: una prevalenza della CWD 30 volte maggiore è stata infatti documentata in animali omozigoti per la serina in posizione 225 rispetto agli animali eterozigoti, nei quali il tempo d’incubazione è risultato ben più lungo. Polimorfismi addizionali ai codoni 95 (glutamina o istidina), 96 (glicina o serina) e 116 (alanina o glicina) sono stati altresì segnalati nel cervo a coda bianca (*Odocoileus virginianus*) (Heaton et al., 2003; Johnson et al., 2006). Il genotipo QGA è più frequente nei cervidi affetti da malattia rispetto al QSA (Johnson et al., 2003; O’Rourke et al., 2004). Il cervo delle Montagne Rocciose (*Cervus canadensis nelsoni*), invece, presenta una sequenza codificante che è polimorfica in corrispondenza del codone 132 (metionina o leucina) (Schatzl et al., 1997; O’Rourke et al., 1999). A tal proposito, studi sperimentali

(Hamir et al., 2006; O'Rourke et al., 2007) indicano che i genotipi con gli alleli 132LL e 132ML sarebbero più resistenti nei confronti della CWD, mentre gli individui 132MM omozigoti sarebbero maggiormente suscettibili nei confronti della malattia (Fox et al., 2006). Sebbene nessun genotipo sia in grado di fornire una resistenza completa, qualora il periodo d'incubazione e la patogenesi dell'infezione ne risultassero significativamente influenzati, come avviene nella Scrapie ovina, ciò potrebbe avere importanti implicazioni ai fini dello sviluppo di strategie di gestione sanitaria e di controllo anche nei confronti della CWD (Landini & Di Guardo, 2013).

Anche nel topo, la suscettibilità/resistenza nei confronti della Scrapie risultano influenzate in maniera determinante dal gene *PRNP*. Come già accennato in precedenza, infatti, in questa specie sono stati identificati due diversi alleli, *PRNP-a* e *PRNP-b*, in base ai polimorfismi presenti a livello dei codoni 108 e 189, associati rispettivamente ad una maggiore o minore suscettibilità alla Scrapie sperimentalmente indotta (Westaway et al., 1987; Moore et al., 1998). Inoltre, grazie ad una serie di approfonditi studi condotti sull'arvicola (*Myodes glareolus*), è stato dimostrato che quest'ultima specie risulterebbe essere molto sensibile nei confronti della Scrapie "classica". Il gene *PRNP* dell'arvicola, infatti, presenta un sito polimorfico a livello del codone 109. I soggetti omozigoti M109M mostrano tempi d'incubazione più brevi rispetto ai soggetti eterozigoti M109I (Agrimi et al., 2008). Un ulteriore studio effettuato in parallelo sul topo e sull'arvicola ha prodotto una serie di interessanti risultati. È stata riscontrata, infatti, una diversa suscettibilità nei confronti delle TSE fra l'arvicola e il topo, dal momento che la prima delle due succitate specie risulterebbe maggiormente sensibile alla Scrapie, mentre sarebbe resistente alla BSE. Tale situazione non sarebbe dissimile, in linea di massima, rispetto a quanto osservato nei corrispondenti modelli murini d'infezione sperimentale. È stato altresì rilevato che i polimorfismi a livello dei codoni 154 e 169 del gene *PRNP* sarebbero in grado di conferire una maggiore o una minore suscettibilità nei confronti dell'infezione, con successivo sviluppo di diversi fenotipi clinico-patologici in relazione ai differenti ceppi di agente prionico inoculati nelle arvicole oggetto di indagine (Agrimi et al., 2008).

Infine, per quanto concerne, le TSE umane, sono state descritte oltre 20 mutazioni puntiformi a livello del gene *PRNP*, alcune delle quali associate inevitabilmente alla

comparsa di malattia e responsabili, pertanto, dello sviluppo di quelle forme ereditarie che colpiscono l'uomo quali fCJD, GSS e FFI (Prusiner, 1998).

È interessante notare, a tal proposito, che la vCJD ha colpito pressoché esclusivamente soggetti con genotipo M129M; pertanto anche in questi casi i polimorfismi del gene *PRNP* giocherebbero un ruolo determinante nel modulare la suscettibilità/resistenza dell'ospite nei confronti della malattia (Ghani et al., 2000).

Per concludere, è utile sottolineare che, con ogni probabilità la suscettibilità/resistenza nei confronti delle malattie da prioni non può trovare spiegazione esclusivamente nell'esistenza di una serie di polimorfismi del gene *PRNP*, ma che goda piuttosto di una sufficiente base di plausibilità biologica l'ipotesi secondo cui il concorso di ulteriori fattori di natura genetica possa contribuire a modulare la suscettibilità/resistenza dell'ospite nei confronti delle TSE (Di Guardo, 2015).

GENOTIPO	CATEGORIA DI RISCHIO	SUSCETTIBILITÀ/RESISTENZA
ARR/ARR	1	Genotipo molto resistente
ARR/ARQ ARR/ARH ARR/ARQ	2	Genotipi resistenti

AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	3	Genotipi poco resistenti
ARR/VRQ	4	Genotipo suscettibile
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	5	Genotipi molto suscettibili

Tabella n. 2: Classificazione delle configurazioni alleliche del gene *PRNP*, a livello dei codoni 136, 154, 171, in rapporto alla suscettibilità/resistenza nei confronti della Scrapie ovina secondo il *National Scrapie Plan* (NSP, UK, 2009).

Alleli	% Ricontrabile nelle diverse razze		
	Sarda	Comisana	Massese
V136R154Q171	0	9,9	4,4

A136R154Q171	55,1	44,6	47,6
A136R154R171	39	41,4	45,9
A136H154Q171	4,5	4,1	1,7
A136R154H171	1,4	0,0	0,3
Numero ovini esaminati	485	111	147

Tabella n. 3: Frequenza dei polimorfismi del gene *PRNP* in ovini di razza Sarda, Comisana e Massese in diverse greggi italiani (Agrimi et al., 2003).

RAZZA	FREQUENZA %
Sarda	51.8
Comisana	13.1
Bergamasca	2.8

Bagnolese	2.0
Massese	1.5
Biellese	1.4
Appenninica	1.2
Laticauda	1.0
Valle del Belice	1.0
Gentile di Puglia	0.9
Leccese	0.8
Pinzirita	0.6
Bergschaf	0.4
Altamurana	0.2
Alpina tirolese	0.2
Barbaresca	0.2
Delle Langhe	0.2
Fabrianese	0.2
Garfagnana	0.2
Jura	0.2
Sambucana	0.2
Carsolina	0.1
Nero Bruna	0.1
Sopravissana	0.1
Ovini merinizzati	2.2
Ovini meticci	17.6
TOTALE	100

Tabella n. 4: Consistenza numerica delle razze ovine in Italia.

REGIONI	OVINI	CAPRINI	TOTALE
Sardegna	3.103.473	297.925	3.404.375
Sicilia	882.971	139.628	1.029.000

Lazio	717.311	47.409	770.494
Toscana	409.528	24.738	435.795
Calabria	272.950	151.189	426.995
Puglia	266.677	69.072	335.816
Basilicata	257.448	63.062	323.997
Campania	213.068	50.095	264.869
Abruzzo	196.411	18.255	215.642
Lombardia	117.683	89.502	210.961
Piemonte	120.201	80.853	203.950
Marche	146.861	9.656	157.462
Umbria	113.774	7.045	121.152
Trentino A.A.	76.981	36.741	115.549
Veneto	73.139	22.340	96.170
Molise	76.524	10.005	86.407
Emilia Romagna	60.072	16.621	76.793
Friuli V.G.	21.604	7.287	28.885
Liguria	13.401	11.644	25.097
Valle d'Aosta	2.443	5.300	7.784
TOTALE	6.965.753	1.158.367	8.337.193

Tabella n. 5: Consistenza numerica del patrimonio ovi-caprino su base regionale; valori calcolati al 31 Gennaio 2016 sulla scorta dei censimenti effettuati o, in alternativa, mediante i registri di stalla (BDN dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto zooprofilattico sperimentale "G. Caporale" di Teramo).

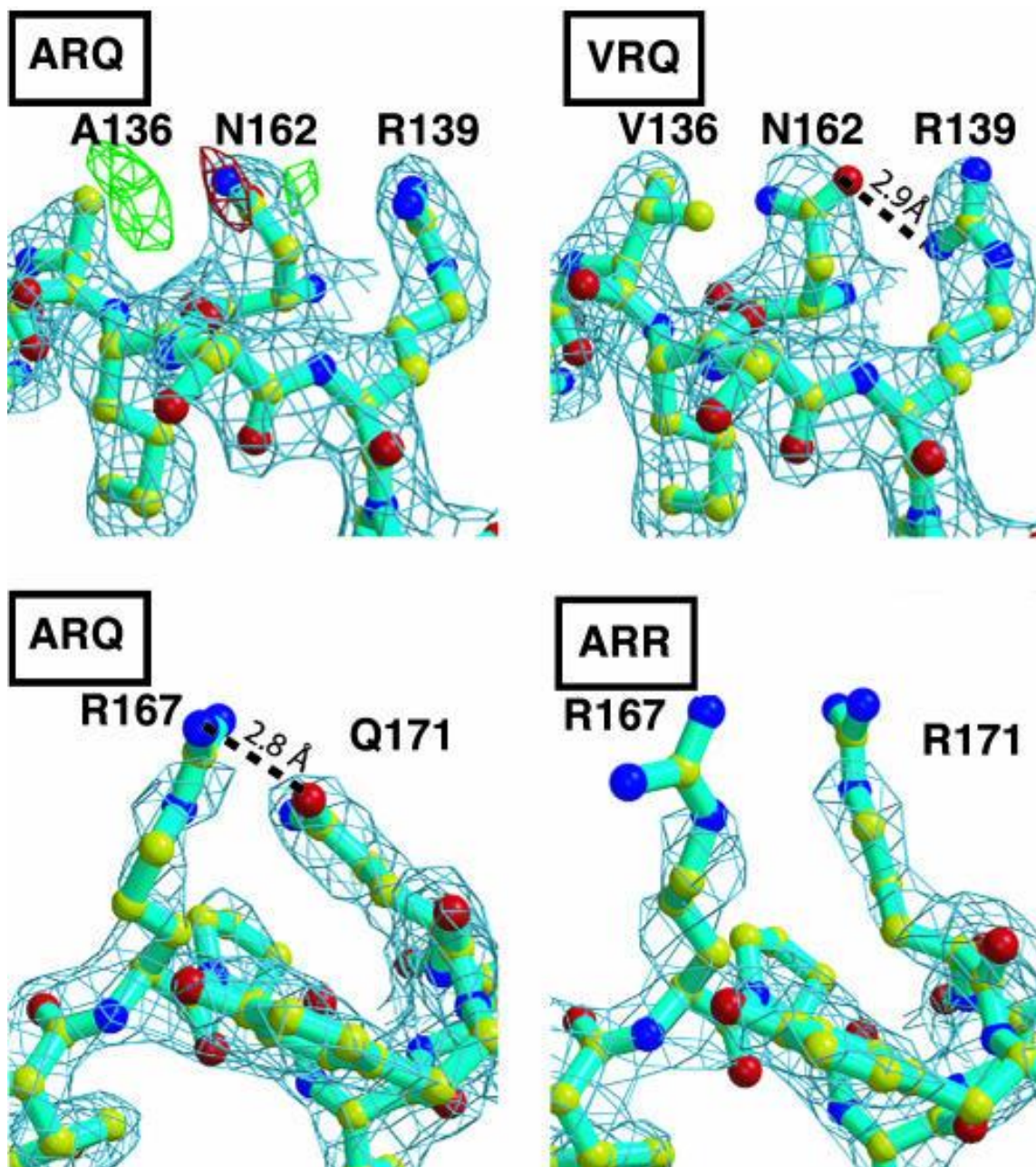


Fig. n. 6: Configurazioni spaziali della PrP^C in relazione alle diverse configurazioni alleliche del gene *PRNP* nella specie ovina (Eghiaian et al., 2004).

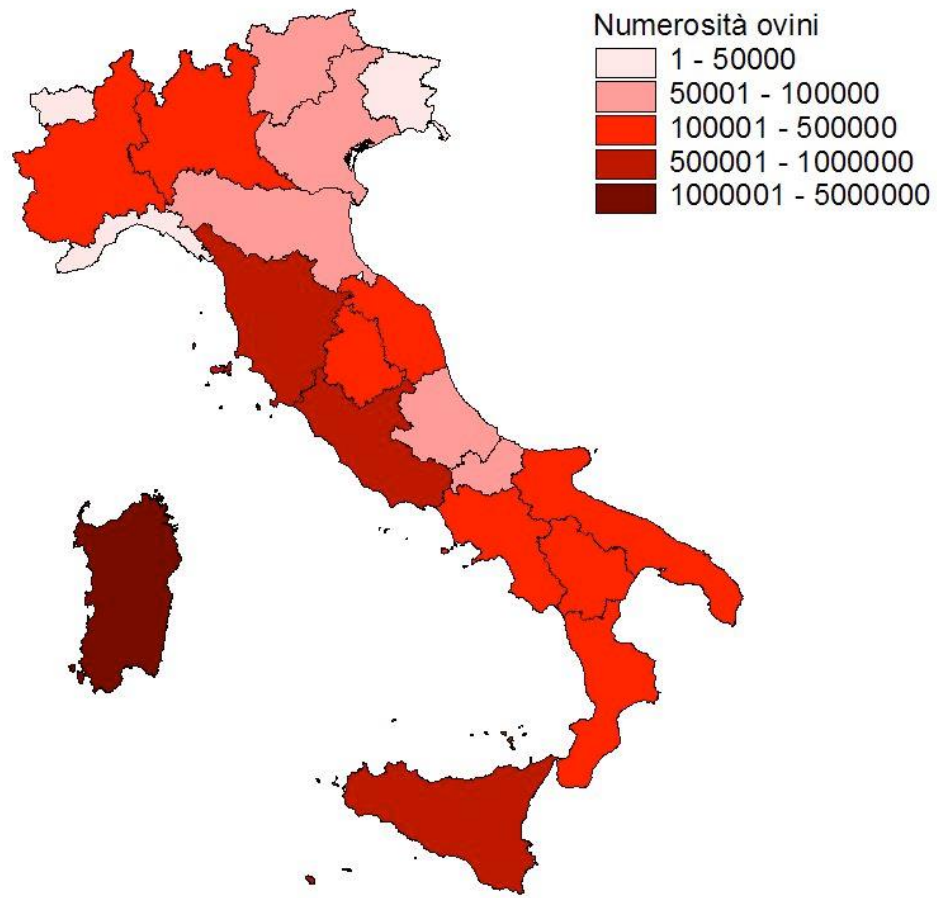


Fig. n. 7: Numerosità degli ovini allevati in Italia per Regione (Regioni e Banca Dati Nazionale, BDN).

1.2 LA SCRAPIE OVINA

1.2.1 Epidemiologia e modalità di trasmissione

La Scrapie ovina è una malattia neurodegenerativa cronica, a decorso inesorabilmente fatale che colpisce la pecora e la capra (segnalata anche nel muflone), conosciuta fin dal XVIII secolo e considerata unanimemente il “prototipo” delle TSE (Di Guardo, 2015).

Scoperta per la prima volta in Inghilterra nel 1732, si è diffusa molto probabilmente da allevamenti di pecore *Merinos* della Spagna verso l'Europa Centrale in seguito alla movimentazione di animali durante la fase preclinica dell'infezione. Attualmente la malattia ha assunto una diffusione cosmopolita, ma fanno eccezione l'Australia e la Nuova Zelanda che, pur possedendo all'interno della popolazione animali portatori di polimorfismi del gene *PRNP* in grado di conferire suscettibilità nei confronti della Scrapie, risultano ad oggi indenni dalla patologia (Detwiler & Baylis, 2003). La sua diffusione, unitamente alla continua evoluzione della sua distribuzione in ambito territoriale, hanno consentito di affermare che la Scrapie è una malattia infettiva contagiosa. In Italia è stata diagnosticata per la prima volta da Cravero nel 1976 in un gregge di pecore di razza Biellese della provincia di Cuneo (Cravero et al., 1977) e per molti anni la situazione epidemiologica relativa alla diffusione dell'infezione nelle diverse Regioni italiane è rimasta sconosciuta. L'incidenza regionale della malattia in Italia (dal 1995 al 2015), l'andamento della prevalenza della stessa e l'andamento temporale dei focolai di Scrapie ovi-caprina nel nostro Paese sono illustrati nelle Figg. nn. 8-11.

Uno dei fattori che con ogni probabilità ha favorito l'enorme diffusione e la prolungata circolazione dell'agente patogeno nella popolazione ovina è il periodo d'incubazione insolitamente lungo che caratterizza la Scrapie. Esso è influenzato, come già esposto in precedenza, dal ceppo prionico responsabile e dal genotipo dell'ospite, che attraverso i vari polimorfismi del gene *PRNP* controllerebbe la dinamica della replicazione dell'agente. Unitamente al gene *PRNP*, altri fattori genetici dell'ospite potrebbero modificare la durata del periodo d'incubazione; è stato dimostrato, infatti, in un caso di Scrapie sperimentale murina, che esistono una serie di “*multiple quantitative trait loci*”

situati all'interno dei cromosomi 2, 6, 7, 11 e 12 del topo (Di Guardo, 2015). Restano ancora da chiarire tuttavia, quali siano le fonti d'infezione nonché le vie di eliminazione dell'agente patogeno, al fine di comprenderne a fondo le modalità di diffusione. A questo proposito è stata documentata da tempo, in condizioni naturali, la trasmissione orizzontale, in cui l'infezione si realizza principalmente per via orale (Pattison & Millson, 1960; Pattison et al., 1972, 1974; Foster et al., 2001a).

L'apparato gastroenterico rappresenta uno dei principali siti di replicazione precoce dell'agente causale, che potrebbe pertanto essere escreto attraverso le feci (Detwiler & Baylis, 2003; Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Mabbott & MacPherson, 2006; Safar et al., 2008). Gli studi effettuati negli ultimi anni, grazie anche all'ausilio della tecnica *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA), mediante la quale è stata accertata la presenza di PrP^{Sc} nelle feci di animali infetti, hanno confermato quest'ultimo dato (Terry et al., 2011). È interessante notare, però, che mediante l'utilizzo di saggi biologici basati sull'impiego di roditori, nonché, di appropriati test immunologici, alcuni Autori hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} all'interno delle feci, sia durante il periodo di incubazione sia quando la malattia giungeva agli stadi terminali. In particolare, i saggi biologici hanno documentato alti livelli di infettività nelle feci di animali infettati per via orale, ma bassi livelli di infettività in seguito a infezione per via intracerebrale ed intraperitoneale. Questo dato potrebbe suggerire che, in seguito ad infezione per via orale, l'agente prionico potrebbe essere albergato ed essere escreto attraverso il tratto gastroenterico già durante la fase preclinica dell'infezione, oltre al fatto che la via di trasmissione condizionerebbe in maniera determinante la patogenesi dell'infezione stessa e, di conseguenza, la via di escrezione del prione (Safar et al., 2008).

Gli studi condotti negli anni passati avevano già consentito di ipotizzare che le ghiandole salivari potessero svolgere un ruolo nell'escrezione della Scrapie, anche se non era stata dimostrata la presenza della PrP^{Sc} nelle stesse o nella saliva (Vascellari et al., 2007). Questi studi, infatti, avevano rivelato la sola presenza di un'attività trascrizionale del gene *PRNP*, con conseguente sintesi di PrP^C a livello delle ghiandole salivari (Hermann et al., 2000). Attualmente si ritiene che la saliva possa rappresentare un importante mezzo di diffusione dell'agente della Scrapie, sia grazie alla documentata presenza di infettività

nella saliva di cervidi CWD-infetti (Mathiason et al., 2006), sia grazie alla dimostrata presenza di PrP^{Sc} nelle ghiandole salivari di ovini sperimentalmente infetti (Hermann et al., 2000; Vascellari et al., 2007). In uno studio condotto successivamente, mediante l'ausilio della tecnica PMCA, è stata dimostrata la presenza di PrP^{Sc} in secreti della cavità buccale di pecore affette da Scrapie (Maddison et al., 2010).

È oramai opinione comune che la placenta di animali infetti rappresenti la più importante fonte di infezione, nonché di contaminazione ambientale. Nel lontano 1974 Pattison già aveva dimostrato, infatti, che somministrando placenti provenienti da pecore infette ad altri soggetti sani, questi ultimi sviluppavano la malattia (Pattison et al., 1974). Successivamente, Onodera (1993), pur non avendo rilevato mediante WB la presenza di PrP^{Sc} nella placenta di due pecore affette da Scrapie, osservò che inoculando materiale placentare proveniente da tali soggetti in topini da laboratorio, questi manifestavano sintomi neurologici riferibili appunto alla Scrapie, confermando così l'infettività di tale distretto. Si comprese, quindi, che il parto potesse rappresentare un momento cruciale ai fini della trasmissione orizzontale dell'infezione, proprio a causa del ruolo chiave svolto dalla placenta, la quale può veicolare notevoli quantità di PrP^{Sc} anche in animali asintomatici, determinando al contempo la contaminazione diretta dell'ambiente circostante (Race et al., 1998; Tuo et al., 2001, 2002; Andreoletti et al., 2002).

Le cellule trofoblastiche multinucleate molto probabilmente svolgono un ruolo-chiave nel mantenimento della PrP^{Sc} a livello placentare (Lacroux et al., 2007). È stato altresì dimostrato che la placenta di un animale infetto può albergare o meno PrP^{Sc} anche in corso di successive gestazioni e ciò sarebbe in diretta relazione con il genotipo del feto (Race et al., 1998). In particolare, è stato osservato che pecore portatrici di feti con genotipo Q171R sono risultate resistenti all'accumulo placentare di PrP^{Sc} (Tuo et al., 2002; Santucci et al., 2010), mentre pecore affette da Scrapie e gestanti feti con genotipo ARQ/ARQ sarebbero in grado di accumulare PrP^{Sc} a livello placentare ed animali con feti dotati di genotipo ARQN(176)/ARQK(176) o ARQ/ARR non sarebbero in grado di albergare PrP^{Sc} a livello placentare. Inoltre, gli stessi Autori hanno suggerito che anche i polimorfismi presenti a livello del codone 141 possano influenzare la deposizione placentare di PrP^{Sc}. Infatti, è stato osservato che in feti ovini portatori di polimorfismi del gene *PRNP* diversi da quelli

presenti a livello del codone 171, si può avere un mancato accumulo placentare di PrP^{Sc} (Santucci et al., 2010).

Anche nella capra (*Capra hircus*) in corso di Scrapie naturale la placenta albergherebbe notevoli quantità di PrP^{Sc} (O'Rourke et al., 2011).

E' stato anche ipotizzato che l'agnello possa contrarre l'infezione durante il puerperio. La trasmissione nella fase puerperale è stata suggerita dall'osservazione che agnelli nati da pecore gravide infette sviluppavano la malattia molto precocemente rispetto agli altri (Dickinson et al., 1976).

Per quanto concerne la trasmissione verticale dell'infezione, i dati sono piuttosto scarsi. Foster (1992), mediante il trasferimento di embrioni di 5–6 giorni d'età da pecore affette da Scrapie a pecore sane, aveva osservato la malattia in 6 agnelli su 20, affermando quindi che la trasmissione dalla madre alla prole potesse avvenire precocemente. Al contrario, in uno studio simile, (Foote, 1993), non vennero riscontrati casi di Scrapie in discendenti ottenuti trasferendo embrioni da pecore donatrici infette a riceventi sane. Successivamente, in ulteriori studi (Foster et al., 1999, 2004) d'infezione sperimentale su capre e pecore con l'agente della BSE, non si osservò alcun caso di trasmissione dell'infezione per via verticale. Studi su agnelli nati da madri affette da Scrapie e da madri sane hanno messo in evidenza che non esisterebbe in realtà alcuna differenza nei confronti del rischio di contrarre l'infezione. Infatti, le prime positività alla PrP^{Sc} negli agnelli sono state osservate a partire da 20 giorni d'età in entrambi i casi, a livello delle placche del Peyer, a supporto del fatto che l'infezione non si realizzerebbe per via verticale, ma nel periodo perinatale (Andreoletti et al., 2002). In un altro importante studio, Garza et al (2011) hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nel liquido amniotico ed in alcuni tessuti fetali di ovini affetti da Scrapie naturale a dimostrazione della possibilità di trasmissione verticale dell'infezione.

In un recente studio del 2013, infine, infettando sperimentalmente pecore gravide di razza *Cheviot* con genotipo VRQ/VRQ e VRQ/ARQ (in cui la Scrapie naturale era endemica) con il ceppo SSBP/1 di Scrapie, è stato osservato che la trasmissione prenatale dell'infezione sarebbe possibile nella pecora. In particolare, lo scopo era quello di studiare

la trasmissione verticale della Scrapie sperimentale utilizzando tecniche di *embryo-transfer*, in modo da trasferire gli embrioni in madri surrogate recanti sia genotipi sensibili che resistenti, fornendo quindi preziose informazioni anche sulla suscettibilità nei confronti della malattia. I segni clinici della malattia sono comparsi nella prole, ma la prova dell'infezione da SSBP/1 è stata trovata solamente negli agnelli nati da madri con genotipo *PRNP* completamente sensibile (Foster et al., 2013). Se la trasmissione verticale della Scrapie è possibile, resta da chiarire con quali meccanismi questa possa avvenire. La morfologia placentare della pecora, infatti, rende difficile la comprensione dei meccanismi attraverso i quali l'infezione potrebbe trasmettersi al feto in utero. Gli studi che in passato hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nei tessuti placentari ovini (Andreoletti et al., 2002; Tuo et al., 2002; Alverson et al., 2006) implicano che ci debba essere una qualche comunicazione tra madre e feto che possa spiegare la trasmissione dell'agente causale. A tal proposito, molto interessanti appaiono quelle zone all'interno dei placentomi in cui l'epitelio dei villi coriali ed i tessuti materni appaiono giustapposti. In queste zone, definite ematomi, le cellule del trofoblasto sono coinvolte in processi di fagocitosi di macromolecole e soprattutto di eritrociti (Burton et al., 1976; Santos et al., 1996). Il sangue materno che fuoriesce dai capillari e da altri vasi sanguigni maggiori (Burton et al., 1976) si accumulerebbe nell'interfaccia materno-fetale a livello dell'arcata, andando a costituire la zona dell'ematofago. Qui, oltre agli eritrociti, le cellule del trofoblasto fagocitano anche leucociti materni, cellule epiteliali ed altre cellule circostanti (Myagkaya & Schellens, 1981). In linea teorica, questa zona potrebbe anche consentire il passaggio dell'infezione dalla madre al feto, considerando che il sangue di animali con Scrapie in fase preclinica di malattia presenterebbe alti livelli d'infettività (Houston et al., 2008).

Una fonte alternativa di infezione in utero potrebbe essere, come già detto, il liquido amniotico che pur non presentando alti livelli di PrP^{Sc} potrebbe veicolare l'infezione dalla madre al feto durante la fase di deglutizione fetale che avviene nell'ultimo terzo di gravidanza. È stato dimostrato, infatti, che feti ovini nell'ultimo terzo della gestazione, possono deglutire 20-200 ml di liquido amniotico in 2-7 occasioni consecutive al giorno (Bradley et al., 1973); questa ipotesi sembra andare d'accordo con l'osservazione che la

PrP^{Sc} sarebbe presente molto precocemente all'interno delle placche del Peyer, così come in altri distretti del tratto gastro-enterico di agnelli neonati (Andreoletti et al., 2002).

La via inalatoria può altresì costituire un'ulteriore modalità di acquisizione dell'infezione. Numerosi studi, infatti, documentano l'accumulo di PrP^{Sc} a livello della mucosa nasale (Corona et al., 2009), consentendo di ipotizzare che l'infezione si possa trasmettere per via aerogena (Haybeack et al., 2007; Hamir et al., 2008). Tuttavia, anche se ad oggi i meccanismi di diffusione dei prioni per via respiratoria non risulterebbero totalmente compresi, un recente studio sperimentale del 2016 effettuato nella specie murina ha potuto dare conferme a quelle che negli anni precedenti erano solo ipotesi. In questo studio sono stati utilizzati topi *wild type* e transgenici privi di linfociti B e T, cellule NK, fattori del complemento e FDCs nonché topi Tga 20, sovraespressanti la PrP^C. L'infezione di questi animali attraverso aerosol si è dimostrata efficace, coinvolgendo le vie nervose direttamente, senza cioè una precedente fase di replicazione negli organi linfoidei. Pertanto, un sistema immunitario funzionalmente intatto non sarebbe strettamente necessario per l'infezione aerogena da prioni (Haybeack et al., 2016).

Ancora più interessanti sono, in tale ambito, una serie di ulteriori studi che hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} in distretti che normalmente non costituiscono sedi di accumulo della proteina prionica patologica, quali il rene, la mammella ed il polmone di ovini con Scrapie o affetti contemporaneamente da Scrapie e Visna-Maedi (Ligios et al., 2005; Sisò et al., 2006, 2007; Sisò et al., 2008; Salazar et al., 2010; Ligios et al., 2011). L'attenzione degli studiosi sopra citati si è concentrata in particolar modo sul ruolo svolto dall'urina e dai secreti mammari (colostro e latte) nell'epidemiologia dell'infezione.

La concomitanza delle cosiddette patologie poli-infiammatorie con la presenza di Scrapie e la persistenza/resistenza dei prioni nell'ambiente esterno, rappresentano in tale contesto due punti fondamentali che vale la pena approfondire. Le malattie infiammatorie, e in particolar modo alcune di quelle a decorso cronico, allorquando concomitanti con la presenza di Scrapie, possono agire come “modificatori” ed amplificatori di trasmissione, espandendo la distribuzione tissutale dei prioni. Uno studio condotto nel 2005 mediante l'utilizzo di modelli murini transgenici, aveva già anticipato questo dato e dimostrando,

in particolare, che le infiammazioni linfocitarie croniche possono svolgere un importante ruolo nella diffusione dei prioni, modificandone le vie naturali di eliminazione (Heikenwalder et al., 2005; Seeger et al., 2005).

Questo dato è stato successivamente confermato nell'infezione naturale grazie agli studi condotti da Ligios et al. (2005).

L'individuazione della PrP^{Sc} all'interno delle urine è stata inequivocabilmente dimostrata mediante l'utilizzo di saggi biologici effettuati su topi transgenici. Nel 2005, infatti, è stata dimostrata la presenza del prione all'interno delle urine di topi durante gli stadi preclinici e clinici di Scrapie e, soprattutto quando gli stessi animali erano contemporaneamente affetti da nefrite linfocitaria, oltre ad aver documentato la presenza di infettività nelle urine ("prionuria"), gli stessi studiosi hanno anche concluso che la malattia infiammatoria del rene in soggetti Scrapie-infetti può aumentare l'eliminazione di PrP^{Sc} attraverso le urine (Seeger et al., 2005). Questi dati sono stati successivamente supportati da un altro studio sperimentale che, mediante l'utilizzo della PMCA, ha riportato la prima dimostrazione biochimica di PrP^{Sc} nelle urine di *hamster* affetti da Scrapie in fase terminale. In questo caso, la PrP^{Sc} è stata rilevata in una frazione di urine raccolte mediante filtrazione, cosa che potrebbe indicare che la stessa PrP^{Sc} possa essere associata a cellule come leucociti o cellule epiteliali dei tubuli renali. È importante sottolineare che questo studio ha anche dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nelle urine di animali senza malattie infiammatorie del rene indicando, che ciò sarebbe un pre-requisito indispensabile per escrezione dell'agente prionico (Murayama et al., 2007). Successive indagini hanno dimostrato la presenza di infettività nelle urine di criceti Scrapie-infetti che non presentavano alcun tipo di infiammazione a carico dell'organo escretore, nonché all'interno della vescica urinaria e del parenchima renale (Gregori et al., 2008; Gonzales-Romero et al., 2008).

La potenziale infettività dei secreti mammari è stata oggetto di dibattito per molti anni all'interno della Comunità Scientifica ed i risultati ottenuti in passato, basati sia su saggi biologici che su dati epidemiologici, indicavano chiaramente che colostro e latte non potessero rappresentare mezzi importanti di diffusione delle TSE (Pattison & Millson, 1961; Wilesmith & Ryan, 1997). Tuttavia diversi studi hanno dimostrato in modo esplicito

la presenza di prioni nel latte di ovini Scrapie-infetti. I primi dati sul ruolo potenziale di latte e colostro nell'epidemiologia dell'infezione si basano, come già precedentemente esposto, sul riscontro di PrP^{Sc} all'interno della ghiandola mammaria di pecore infettate con l'agente della Scrapie e affette contemporaneamente da mastiti a carattere linfoproliferativo (Ligios et al., 2005). Studi successivi hanno evidenziato la presenza di infettività nel latte, utilizzato per l'alimentazione di agnelli non affetti da Scrapie nati da madri Scrapie-infette, dimostrando chiaramente che i secreti mammari costituirebbero un importante fonte di eliminazione dell'agente prionico con conseguente accumulo della stessa PrP^{Sc} all'interno del sistema linforeticolare (LRS) degli agnelli (Konold et al., 2008). In seguito, la presenza di infettività è stata dimostrata nel latte di ovini affetti da mastiti a carattere linfoproliferativo con conseguente formazione di follicoli linfatici ectopici come conseguenza dell'infezione da virus della Maedi-Visna. In particolare, è stata documentata la presenza di infettività nel latte di ovini fino a 20 mesi prima delle manifestazioni cliniche di malattia, con specifico riferimento ad animali appartenenti sia al genotipo VRQ/VRQ sia al genotipo ARQ/VRQ. Mediante l'utilizzo di prove biologiche condotte su topi transgenici, è stata altresì dimostrata la presenza di infettività nel colostro e nel latte provenienti da animali non affetti da mastiti croniche linfoproliferative, indicando che tali lesioni infiammatorie della ghiandola mammaria non rappresenterebbero un pre-requisito necessario ai fini dell'escrezione prionica; infine, la comprovata presenza di PrP^{Sc} in tutte le componenti del latte analizzato (frazioni cellulari, crema, caseina del siero) pone una serie di importanti interrogativi in merito al rischio di trasmissione all'uomo di agenti prionici a seguito del consumo di prodotti lattiero-caseari ovini nonché di altre specie animali, oltre che in merito al rischio per gli stessi animali, sia direttamente, sia attraverso la presenza di derivati del latte nei mangimi (Lacroux et al., 2008; Ligios et al., 2011). Un altro studio del 2009, basato sull'impiego della tecnica PMCA, ha altresì dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nel latte di ovini infetti sia durante le fasi pre-clinica e clinica (Maddison et al., 2009).

I meccanismi attraverso i quali i prioni possono essere escreti attraverso il latte risultano essere, tuttavia, ancora poco chiari. Una delle ipotesi al riguardo sostiene che la PrP^{Sc} possa essere trasportata mediante processi di esocitosi da parte delle cellule epiteliali,

oppure attraverso la secrezione da parte di ghiandole apocrine deputate alla produzione di globuli di grasso (Didier et al., 2008). È stato altresì ipotizzato che l'agente prionico possa raggiungere la ghiandola mammaria attraverso la via ematogena. È noto infatti che la PrP^{Sc}, durante la diffusione nella circolazione ematica (Hunter et al., 2002; Terry et al., 2009), risulta associata ad alcune componenti del sangue che verrebbero poi escrete nel colostro e nel latte, tra cui i macrofagi CD68+. Queste cellule si localizzerebbero all'interno della ghiandola mammaria in concomitanza con la presenza di PrP^{Sc} e di contestuali lesioni mastitiche. Ciò darebbe valore all'ipotesi che le patologie infiammatorie della mammella possano in qualche modo amplificare l'eliminazione dell'agente prionico attraverso i secreti mammari. Tuttavia è stato anche osservato che la mancata presenza di cellule CD68+ all'interno del tessuto mammario non precluderebbe l'escrezione dei prioni attraverso il latte, indicando che oltre alla via ematogena possano esistere molteplici e differenti vie di eliminazione dei prioni mediante i secreti mammari (Lacroux et al., 2008).

La presenza di infettività è stata dimostrata anche nel sangue di un certo numero di specie animali infettate sperimentalmente o naturalmente tra cui roditori (Brown et al., 1998; Brown et al., 1999), cervidi (Mathiason et al., 2006), pecore (Houston et al., 2000), capre (Dassanayake et al., 2012) e primati non umani (Bons et al., 2002). È importante sottolineare, a questo proposito, che nel caso della vCJD umana sono stati riportati 4 casi di trasmissione dell'infezione in soggetti che avevano ricevuto trasfusioni di sangue da donatori asintomatici. Ciò supporta grandemente l'ipotesi che il sangue possa rappresentare un ulteriore mezzo di diffusione dell'infettività prionica (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004; Wroe et al., 2006). Più di recente, saggi biologici effettuati mediante l'utilizzo di topi transgenici, hanno rivelato la presenza di infettività in alcuni campioni di plasma di persone affette da sCJD e vCJD (Douet et al., 2014). Anche se i titoli infettanti nel sangue sarebbero molto bassi rispetto a quelli presenti in altri tessuti, la documentata trasmissione dell'infezione a seguito dell'inoculazione di appena qualche centinaio di microlitri di sangue intero Scrapie-infetto per via intracerebrale (IC) a topi sensibili, indicherebbe che la trasmissione dell'infezione mediante trasfusioni possa essere molto più efficiente rispetto a quanto ritenuto in passato (Andreoletti et al., 2012).

La distribuzione dell'infettività tra i componenti del sangue può sostanzialmente variare da specie a specie e da prione a prione. In effetti, mentre gli studi precedenti effettuati su roditori (Brown et al., 1998), primati (Bons et al., 2002), cervidi (Mathiason et al., 2010) e pecore (Houston et al., 2008) avevano chiaramente dimostrato che almeno parte dell'infettività fosse associata ai globuli bianchi (WBC), attualmente è stata rilevata infettività anche nelle piastrine di topi vCJD-infetti (Cervenakova et al., 2003), cervi CWD-infetti (Mathiason et al., 2010), pecore Scrapie-infette (Lacroux et al., 2012) e BSE-infette (McCutcheon et al., 2011). Il rilevamento d'infettività prionica, sensibile e specifico a livello del sangue rappresenta un fondamentale pre-requisito al fine di progettare nuovi test di diagnosi precoce e non invasiva, nonché per migliorare la sicurezza nelle procedure di trasfusione di sangue e degli emoderivati, oltre che per studiare la “prionemia specie/agente-dipendente” nell'uomo e negli animali (Halliez et al., 2014).

Un'altra importante via di trasmissione degli agenti delle TSE è stata identificata in quella iatrogena, in passato ritenuta responsabile di gravi epidemie. Un primo episodio di questa natura si verificò, infatti, negli anni '40 nel Regno Unito in seguito alla somministrazione di un vaccino inattivato nei confronti della *Louping Ill* contaminato dal prione della Scrapie (Gordon, 1946). Più recentemente, l'impiego di un vaccino nei confronti di *Mycoplasma agalactiae* è stato messo in relazione con l'insorgenza di numerosi focolai di Scrapie ovina e caprina in Italia (Agrimi et al., 1999).

Non è nota, al momento, l'esistenza di portatori (“*carriers*”) asintomatici, ovvero di soggetti che siano in grado di diffondere efficacemente il prione della Scrapie, senza che l'infezione si trasformi in malattia clinicamente manifesta. L'eventuale esistenza di *carriers* avrebbe delle ripercussioni epidemiologiche molto rilevanti e rimetterebbe in discussione l'efficacia dei piani di selezione genetica attualmente utilizzati nel controllo della Scrapie (Detwiler & Baylis, 2003).

Un altro fondamentale aspetto riguardante l'epidemiologia delle TSE è quello legato alla persistenza/resistenza dell'agente infettivo nell'ambiente esterno. Un primo esperimento in tale contesto fu effettuato da Grieg (1940), il quale osservò che, pecore sane stabulate

in un ovile chiuso che aveva precedentemente ospitato animali Scrapie-infetti, svilupparono la malattia in assenza di alcun tipo di contatto tra animale e animale (Grieg, 1940). Gli studi di Pattison e Jones risalenti alla fine degli anni '60, avevano consentito di ipotizzare che l'infettività potesse protrarsi nel tempo (Pattison & Jones, 1967). Solamente nel 1991, però, furono effettuati i primi studi sperimentali il cui obiettivo era quello di valutare l'infettività residua in campioni di suolo in cui era stato interrato per oltre 3 anni l'encefalo di un ovino affetto da Scrapie (Brown et al., 1991). Molti anni più tardi in una piccola fattoria dell'Islanda, precedentemente colpita da Scrapie, fu dimostrata con pressoché assoluta certezza la persistenza nell'ambiente per almeno 16 anni (Georgsson et al., 2006). I primi lavori sistematici in tale contesto mettevano in evidenza come la PrP^{Sc} possa interagire con terreni agricoli differenti per caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche, una volta che gli stessi sia stati messi a contatto con campioni di tessuto cerebrale ottenuti da ovini Scrapie-infetti (Leita, 2006). Altri studi effettuati all'incirca nello stesso periodo hanno voluto approfondire le conoscenze sulle proprietà fisico-chimiche dei terreni che potrebbero essere all'origine della persistenza dei prioni nel suolo. E così, analizzando approfonditamente minerali quali montmarillonite, caolinite e quarzo, si è compreso che l'assorbimento della PrP^{Sc} dipende anche dalle proprietà di superficie dei materiali. Oltre ai suddetti materiali, risulta estremamente importante il comportamento delle argille nel veicolare l'infettività (Revault et al., 2005). A tal proposito, ad oggi, la presenza di infettività nei vari materiali può essere svelata sia utilizzando appositi saggi *in vitro*, quale ad esempio la *Standard Scrapie Cell Assay* (SSCA) (Genovesi et al., 2007), sia saggi biologici (*Syrian hamster*), anche se i primi si sono rivelati i metodi più semplici e affidabili. In seguito, grazie all'ausilio di lisimetri, è stato dimostrato che la PrP^{Sc} può persistere nel terreno per oltre 21 mesi, comprovando con questo che la diffusione dei prioni può avvenire anche attraverso le acque reflue (Seidel et al., 2007). Studi più recenti hanno inoltre documentato che l'esposizione di pecore ad un ambiente contaminato durante il parto è sufficiente a causare la malattia e che i pascoli possono mantenere l'infettività per almeno 36 giorni dopo l'allontanamento degli animali infetti (Dexter et al., 2009). Successivamente è stata presa in considerazione, da parte di alcuni Ricercatori, la possibilità che l'infettività potesse essere veicolata non solo dal suolo, bensì dai cosiddetti "*fomites*", vale a dire quegli oggetti e materiali,

utilizzati routinariamente all'interno degli allevamenti, che possono fungere da veicolo dell'infezione. Un apposito studio ha dimostrato, in proposito che l'infettività prionica possa essere veicolata da recinzioni metalliche o in legno, così come da oggetti in plastica (Maddison et al., 2010). A conferma di ciò, uno studio del 2015, *in vivo*, ha dimostrato come, diverse superfici presenti all'interno degli allevamenti (abbeveratoi, recinzioni, mangiatoie, etc), utilizzate da pecore Scrapie-infette 8 settimane prima ed in cui era stata dimostrata la presenza di PrP^{Sc} mediante la tecnica PMCA, sono state in grado di trasmettere l'infezione ad agnelli sani e recanti genotipo VRQ/VRQ (Konold et al., 2015). Un recentissimo studio ha dimostrato infine, sempre mediante la tecnica PMCA, la presenza di PrP^{Sc} all'interno di polveri di comune riscontro in un allevamento affetto da Scrapie (Gough et al., 2015). La presenza di infettività, oltre che nel suolo e nelle varie superfici degli allevamenti, nonché nel particolato aerodisperso, illustra le difficoltà che possono essere associate con la decontaminazione efficace delle suddette aree colpite e, in definitiva con il controllo dell'infezione.

L'epidemiologia e le modalità di trasmissione della Scrapie "atipica" sostenuta dai ceppi *Nor98* e *Nor98-like* risultano nettamente diverse rispetto a quanto si è detto per la Scrapie classica. A partire dal 1998, casi di Scrapie "atipica" sono stati identificati in Europa (compresa l'Italia), principalmente attraverso la sorveglianza attiva su ovini asintomatici (Buschmann et al., 2004; De Bosschere et al., 2004; Nentwig et al., 2007; Orge et al., 2004; Polak et al., 2010). Si tratta di una forma nettamente distinta sotto il profilo biochimico, neuropatologico ed epidemiologico rispetto alla Scrapie "classica". In effetti, la PrP^{Sc} della Scrapie "atipica" risulta essere meno resistente alla proteinasi K rispetto alla omologa PrP^{Sc} della Scrapie "classica", presentando altresì un *pattern* più variabile in *Western blotting*, compresa una caratteristica banda a basso peso molecolare (7-12kDa), non presente nella forma classica (Le Dur et al., 2005). Inoltre la Scrapie "atipica" tende a verificarsi in animali più anziani e negli ovini con genotipo AHQ e ARR, considerati resistenti alla Scrapie "classica" (Benestad et al., 2008). Tuttavia esiste una certa sovrapposizione tra le due forme rispetto alla suscettibilità dell'ospite; in alcuni genotipi, quali ad esempio VRQ/AL141RQ e AL141RQ/AL141RQ, possono coesistere sia casi di Scrapie "classica" che "atipica" (Fediaevsky et al., 2008). Un altro studio condotto al

riguardo, ha confermato, infatti, che entrambe le forme possono coesistere in uno stesso animale dotato di genotipo AL141RQ/AF141RQ (Mazza et al., 2010). Ad oggi si pensa che la Scrapie “atipica” non possa essere trasmessa in condizioni naturali; è quindi opinione comune che essa possa rappresentare una forma spontanea, “sporadica” e “non contagiosa” di Scrapie (Benestad et al., 2008); tuttavia, è stata anche dimostrata con successo la trasmissione sperimentale dell’infezione in ovini ed in topi transgenici. I primi, in particolare, presentavano un quadro sintomatologico simile a quello osservato nelle infezioni originarie degli ovini (Le Dur et al., 2005; Simmons et al., 2007, 2010; Andreoletti et al., 2011). Infine, in uno studio del 2015 alcuni Ricercatori, facendo ricorso ai campioni presenti in un archivio di materiale biologico proveniente da ovini sia sani che affetti da Scrapie, hanno identificato tre casi di Scrapie “atipica”, tra cui una pecora, morta nel 1972; due ulteriori casi, mostravano altresì evidenze di infezione mista con Scrapie “classica”/Scrapie “atipica”. I due succitati casi indicherebbero che le infezioni associate possano esser presenti da molto tempo, contribuendo altresì ad aumentare la variabilità dei ceppi di Scrapie (Chong et al., 2015).

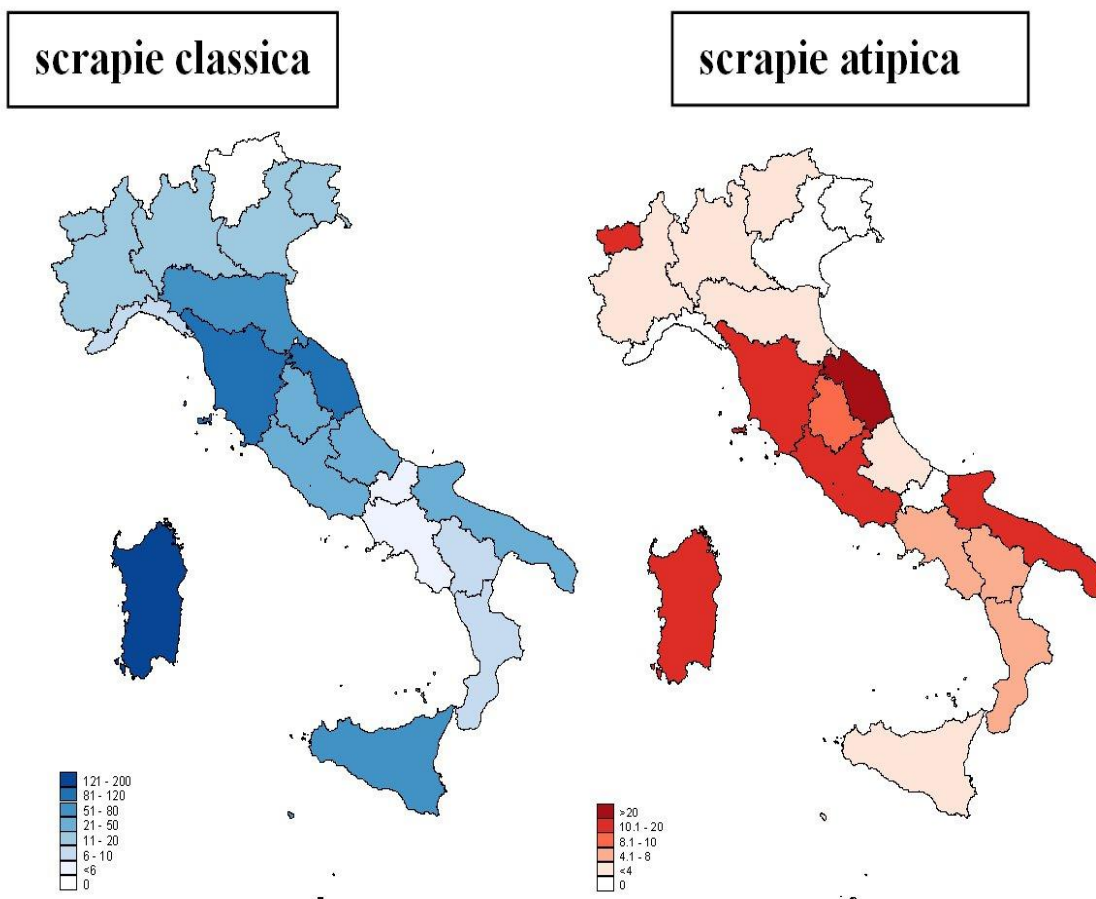


Fig. n. 8: Incidenza regionale (numero di focolai/10.000 allevamenti) della Scrapie classica e della Scrapie atipica in Italia dal 1995 al 2015 (<http://www.izsto.it>)

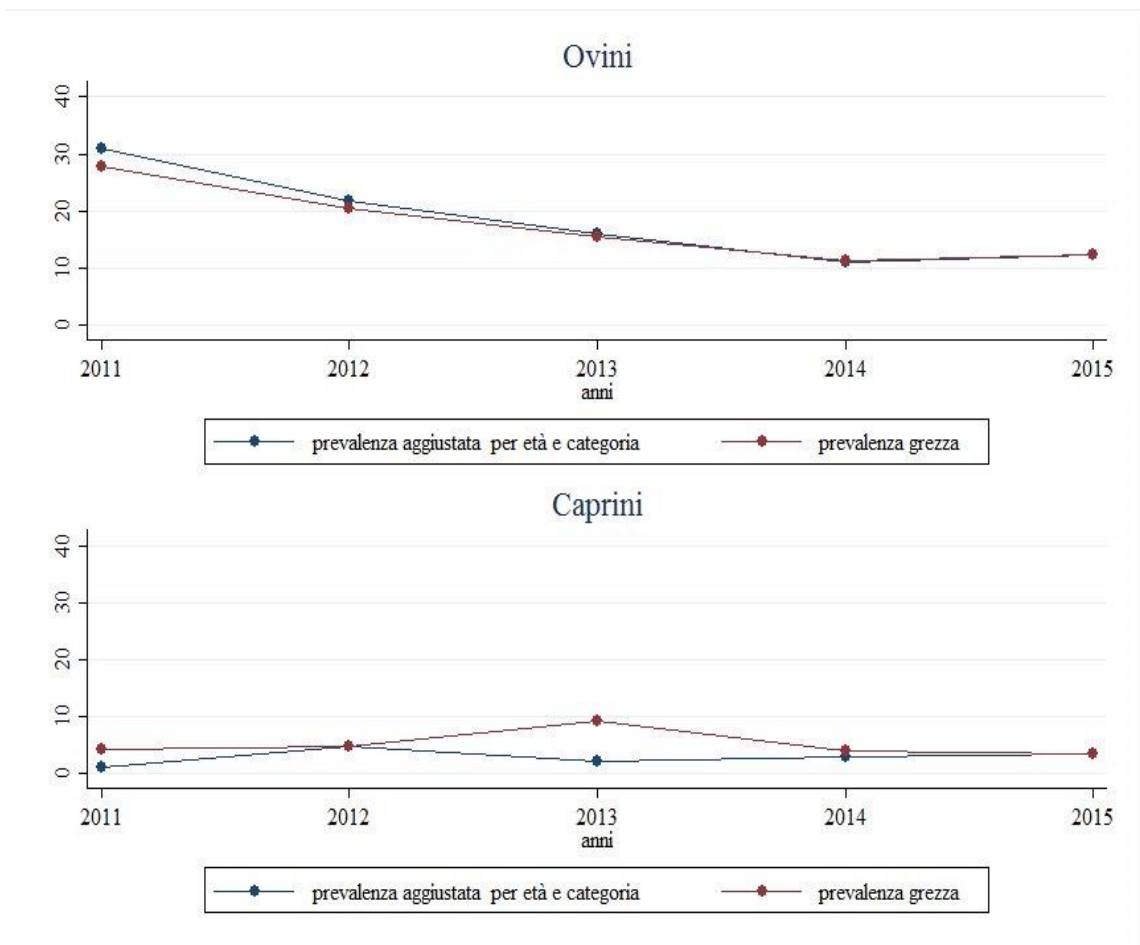


Fig. n. 9: Scrapie classica: andamento della prevalenza (casi accertati/10.000 test rapidi effettuati) per specie osservata nell'ambito dell'attività di sorveglianza attiva negli anni 2010 – 2015 (a seguito di aggiustamento per età e categoria) ([http:// www.izsto.it](http://www.izsto.it)).

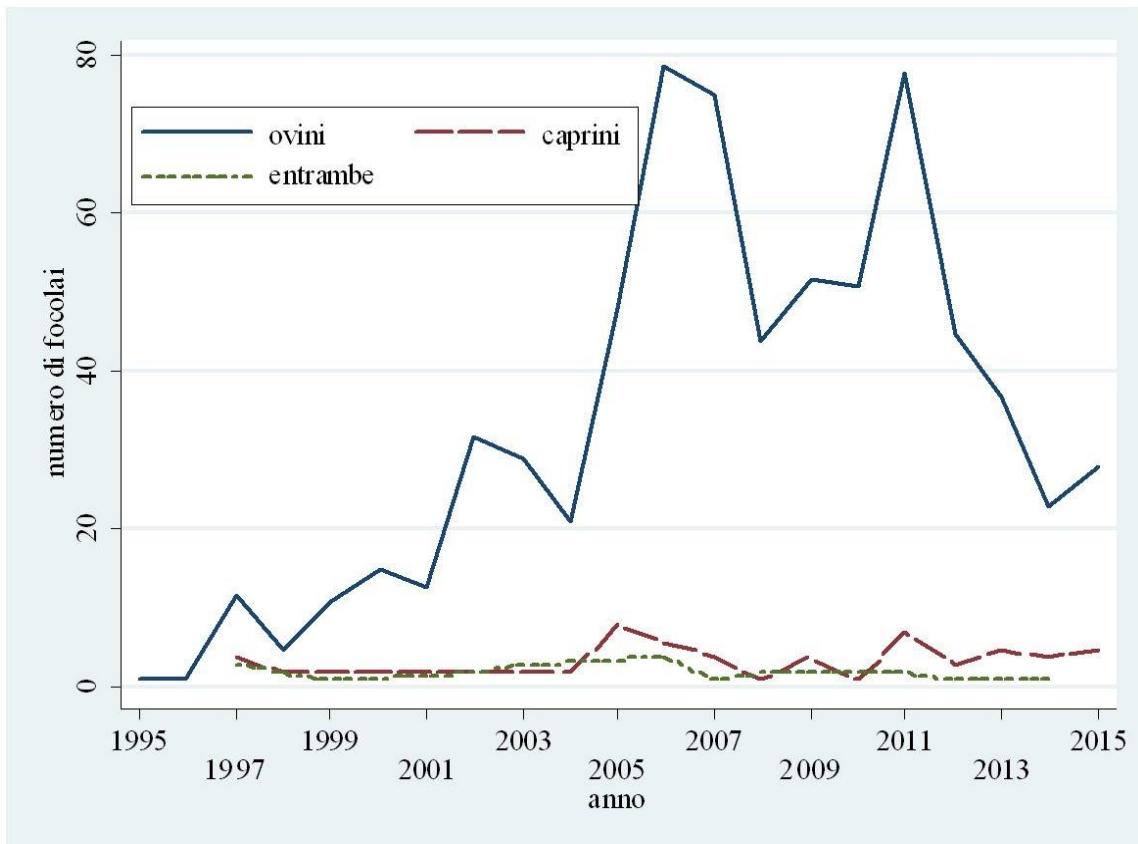


Fig.n. 10: Trend temporale dei 789 focolai di Scrapie in Italia nel periodo 1995-2015, suddivisi per specie e per anno (senza distinzione tra forme classiche e forme atipiche) (<http://www.izsto.it>).

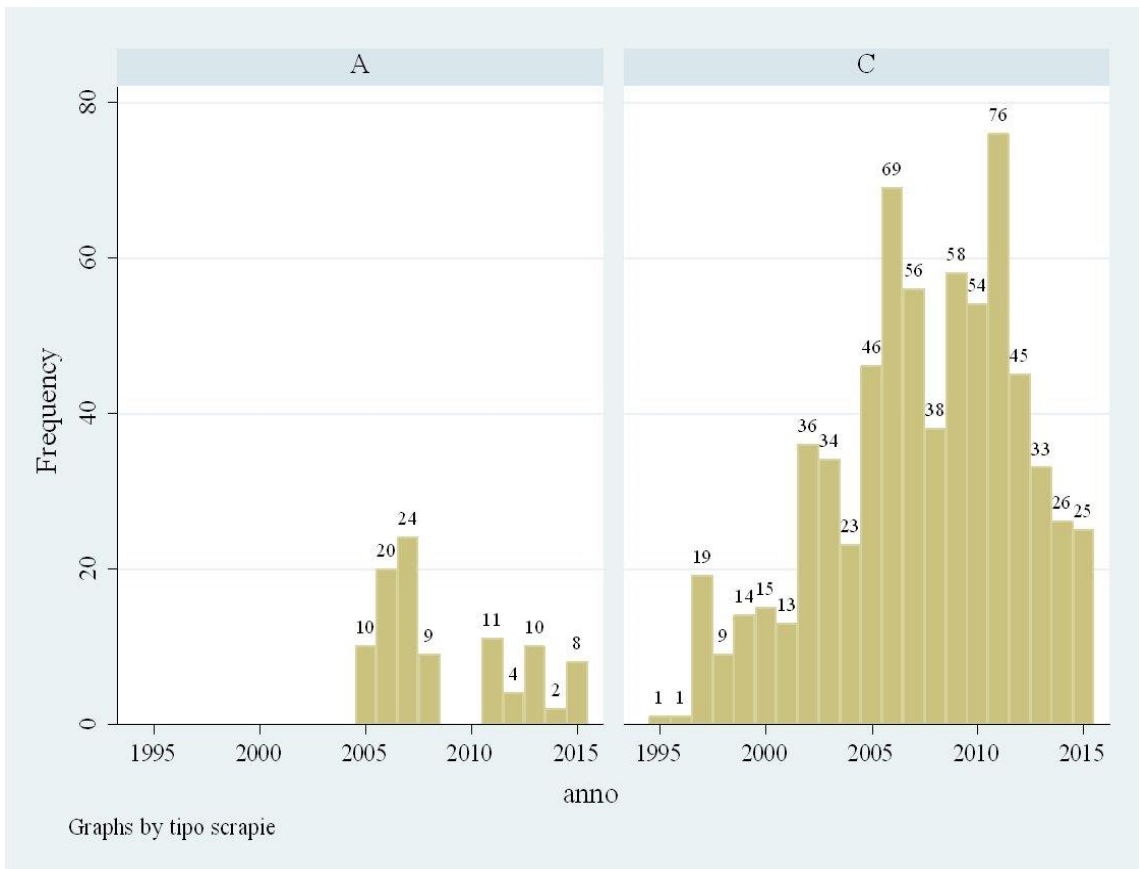


Fig. n. 11: Trend temporale dei focolai, nel periodo 1995-2015, suddivisi per tipo di Scrapie (A= atipica; C= classica) (<http://www.izsto.it>).

1.2.2 Caratteristiche cliniche e neuropatologiche

a) Caratteristiche cliniche

La Scrapie ovina non compare, di regola, in animali di età inferiore a 2 anni, manifestandosi in genere a 3-4 anni di vita a causa del lungo stadio prodromico, che varia da parecchi mesi fino a 4-5 anni. Il periodo di incubazione della malattia è influenzato, al pari del il suo fenotipo clinico-patologico, dal ceppo prionico responsabile e dal genotipo dell'ospite (Di Guardo, 2015). A causa dell'influenza esercitata dalle suddette variabili, la malattia ha assunto manifestazioni cliniche differenti da territorio a territorio. La prova di ciò risiede nel fatto che in alcuni Paesi la malattia, che può avere una durata anche di più mesi, è stata indicata con nomi diversi, a seconda della manifestazione clinica più frequentemente osservata: *Scrapie* (grattamento, prurito), come la malattia è comunemente nota; *rida* (atassia) in Islanda; *tremblante* (tremore) in Francia; *traberkrankheit* (malattia del trotto) in Germania.

Al pari di tutte le altre TSE, la sintomatologia della Scrapie ha carattere progressivo con durata variabile da poche settimane ad alcuni mesi, culminando inevitabilmente con il decesso dell'animale, che si manifesta in genere a partire da circa un paio di settimane a 6 mesi dalla comparsa dei segni clinici. La Scrapie decorre costantemente in assenza di febbre (D'Angelo et al., 2007; Di Guardo, 2015).

Le prime manifestazioni cliniche consistono generalmente in disturbi comportamentali, quali ipereccitabilità o – a seconda dei casi – stato stuporoso (cosiddetto “*star gazing*” degli autori anglosassoni) (Fig. n. 13) e depressione del sensorio. Fanno seguito, in lenta progressione, tremori muscolari, atassia locomotoria, cecità (come conseguenza dell'accumulo di PrP^{Sc} anche a livello della retina) (Hortells et al., 2006), paralisi flaccida o spastica del treno posteriore, digrignamento dei denti, dimagrimento (non sempre presente), crisi ipotoniche, aggressività, scialorrea, disfagia, e rigurgito alimentare, segno

clinico, quest'ultimo, riscontrato più frequentemente nella specie caprina. La Fig. n. 14 riportiamo la frequenza dei più comuni sintomi clinici osservati in corso di Scrapie ovina (D'Angelo et al., 2007).

Per quanto attiene al sintomo ritenuto predominante, ossia il prurito, seppur non patognomonica, tale manifestazione si verifica spesso a carico dei fianchi con conseguente perdita del vello e comparsa di abrasioni cutanee più o meno gravi ed estese, conseguenti al continuo strofinamento del corpo contro oggetti fissi (Figg. nn. 12 e 15). In alcuni individui, inoltre, il grattamento può stimolare un riflesso (“*nibble reflex*”) che consiste in un caratteristico sbattimento e retrazione delle labbra, associato a protrusione della lingua quando viene grattato il dorso dell'animale o quando si applica uno stimolo pressorio alla base della coda (Di Guardo, 2015).

Da quanto finora esposto appare chiaro che la Scrapie ovina può presentare un'ampia gamma di caratteristiche cliniche e patologiche e soprattutto che le variazioni del fenotipo patologico di volta in volta riscontrato sono attribuibili principalmente a differenze genotipiche esistenti tra gli animali colpiti, nonché al ceppo di agente responsabile dell'infezione. L'influenza di questi fattori sulle caratteristiche cliniche della malattia è stata ampiamente studiata nel corso degli anni; per tale motivo è utile comparare i risultati di alcuni studi finalizzati alla valutazione, in termini di frequenza, dei principali segni clinici rilevati in corso di Scrapie. Alcuni Autori (Cockcroft et al., 2006; Kuncheva et al., 2007) hanno confermato che in corso di Scrapie le manifestazioni cliniche considerate “classiche” non sono affatto costanti. Infatti, in un gregge di animali in cui erano presenti sia soggetti sani che malati, alcuni segni clinici quali perdita di peso e lesioni cutanee non erano costantemente presenti tra gli ovini affetti da Scrapie (Kuncheva et al., 2007). Per quanto riguarda i segni clinici meno frequenti, alcuni studi descrivono al riguardo, una condizione di iper-reattività al suono (battito di mani) negli animali affetti da Scrapie, variabile tra il 29,4% e il 50% (Healy et al., 2003; Vargas et al., 2005). Anche per quanto concerne il “*nibble reflex*”, i dati presenti in letteratura risultano essere alquanto discordanti. In alcuni casi infatti, il succitato riflesso è stato riscontrato nel 49% degli animali affetti da Scrapie (Vargas et al., 2005), mentre lo stesso risultava maggiormente rappresentato in altri studi (Healy et al., 2003).

Uno studio condotto in senso retrospettivo nelle isole Shetland su un numero elevato di casi sospetti, confermati e non – 772 animali sospetti esaminati di cui 574 positivi e 198 negativi – ha fornito preziose informazioni consentendo di porre in relazione il segno clinico con l'effettiva presenza di malattia. I segni clinici più attendibili ai fini della diagnosi clinica si sono rivelati il prurito, la perdita di lana, l'iperestesia, l'atassia e il dimagrimento (Cockcroft et al., 2006).

Nel 2012 alcuni Autori, infettando sperimentalmente 65 animali appartenenti a due diverse razze (Suffolk e Cheviot) e a 4 differenti genotipi attraverso due differenti vie di trasmissione (orale e sottocutanea) hanno ottenuto importanti risultati soprattutto nella correlazione esistente tra la suscettibilità alla Scrapie e il fenotipo clinico-patologico. I dettagli relativi alla frequenza e gravità dei segni clinici rilevati in questo studio sono stati i seguenti: l'atassia era il segno clinico predominante, presentandosi nell'89% delle pecore interessate, la perdita di peso è stato il meno comune dei segni clinici essendo presente solo nel 24% dei casi. La disfagia era presente nel 37% degli animali colpiti e il prurito mediamente nel 47% delle pecore, mentre i cambiamenti comportamentali nel 58%. La gravità degli ultimi tre segni clinici (disfagia, prurito e cambiamenti comportamentali) era moderata quando presente, mentre l'atassia costituiva il segno clinico più evidente. I risultati di questo studio suggeriscono, a loro volta, che il fenotipo clinico di Scrapie ovina rappresenti il risultato della complessa interazione tra diversi fattori, quali sorgente d'infezione, nonché animali donatori e destinatari della medesima (González et al., 2012).

Una valutazione clinica dettagliata è stata altresì eseguita su 162 casi Scrapie classica confermati in Gran Bretagna (Konold et al., 2009). Le manifestazioni cliniche maggiormente evidenti in questo studio di campo sono state il prurito (97%) e la perdita di peso (76%). Una significativa associazione è stata riscontrata tra presenza di tremori, alterazioni comportamentali, perdita di condizione corporea, andatura anomala, digrignamento dei denti, prurito ed altre manifestazioni cliniche. Questo studio ha confermato la variabilità dei segni clinici in corso di Scrapie, anche se quasi tutte le pecore hanno mostrato il prurito come sintomo pressoché costante. La presentazione clinica può essere dunque influenzata dal genotipo dell'ospite (ed, eventualmente, dalla razza, gregge o dal ceppo di agente predominante) (Konold et al., 2009).

Gli stessi Autori, avevano già dimostrato che i segni clinici più frequentemente riscontrati in corso di BSE nell'ovino sarebbero prurito, alterazioni comportamentali, alopecia, lesioni cutanee, digrignamento dei denti, tremore, atassia e perdita di peso, con la frequenza e la gravità di ciascuno dei sintomi che si accrescerebbero al progredire della malattia (Konold et al., 2008).

In uno studio più recente Simmons et al (2016), hanno riportato che anche la BSE nelle sue forme “atipiche” (BSE-L) può essere trasmessa sperimentalmente per via intracerebrale a pecore appartenenti a diversi genotipi ad eccezione degli animali con genotipo ARR/ARR. Il monitoraggio clinico, effettuato in diversi periodi post-infezione, ha evidenziato che il fenotipo sintomatologico non assomiglia a quello di alcun'altra TSE precedentemente conosciuta in questa specie. In particolare il prurito, con conseguente perdita del vello, nonché l'atassia sarebbero manifestazioni cliniche presenti in un esiguo numero di animali, risultando al contempo incostanti e indistinguibili da quelle riscontrate in corso di Scrapie classica e BSE classica sperimentalmente trasmessa all'ovino. Più frequentemente invece, gli animali affetti mostravano una particolare forma di malattia caratterizzata da episodi di collasso e riduzione del tono muscolare, spesso associati a concomitante abbassamento della testa e inizialmente attivati mediante semplici manualità quali ad esempio il sollevamento del collo oppure da eventi più stressanti come il moderato “*courettage*” del piede ai fini della visita clinica (Simmons et al., 2016).

Al precipuo scopo di identificare e inquadrare correttamente i sospetti clinici, negli ultimi anni è stato messo a punto un protocollo finalizzato a valutare la presenza di segni clinici caratteristici associati a forme pruriginose e non pruriginose di TSE negli ovini, che potrebbe essere applicato anche alla specie caprina. In particolare, il protocollo comprende la valutazione del comportamento, la funzionalità visiva (risposta al riflesso della minaccia), la presenza di prurito e la valutazione dell'andatura degli animali. Il protocollo in oggetto permette lo *screening* di animali per i segni clinici di Scrapie entro un breve lasso di tempo. Esso può essere applicato, inoltre, a studi sperimentali in pecore e capre per monitorare l'esordio clinico, la progressione e la fase terminale della malattia. Anche se un esame clinico generalmente possiede un minor indice di sensibilità nel rilevare gli animali affetti da TSE rispetto ai test *post mortem*, questo rappresenta,

attualmente, l'unico metodo applicabile su animali vivi, soprattutto in quei Paesi che non dispongano di sistemi di sorveglianza adeguati atti all'identificazione delle TSE nei piccoli ruminanti (Konold & Phelan, 2014).

Nella specie caprina, in caso sia di Scrapie che di BSE, le manifestazioni cliniche appaiono ben più variabili e poco costanti. I principali segni clinici sono costituiti in questa specie da iper-reattività agli stimoli esterni (con assenza di reazione alla minaccia), atassia, tremori e deficit posturali (Konold et al., 2010).

Per quanto attiene alla Scrapie "atipica", i segni clinici più frequentemente riscontrati sono rappresentati nella specie ovina da atassia, alterazioni comportamentali (movimenti di maneggio), perdita di peso, comparsa di uno stato ansioso/confusionale ed altri sintomi meno costanti come l'assenza di risposta al riflesso della minaccia unilateralmente o bilateralemete. Il dato costante, tuttavia, risulta essere l'assenza di prurito con successiva perdita del vello e comparsa di zone alopeciche, manifestazioni osservate pressoché costantemente sempre in corso di Scrapie classica (Konold et al., 2007; Benestad et al., 2008; Simmons et al., 2010; Cook et al., 2016).

b) Caratteristiche neuropatologiche

All'esame necroscopico gli animali mostrano variabili e più o meno evidenti segni di deperimento organico, eventuali abrasioni cutanee causate dal grattamento, ma nessuna alterazione macroscopica a carico del sistema nervoso centrale (SNC), ad eccezione (dato non sempre presente) di un modesto aumento del liquido cefalo-rachidiano associato ad una lieve ectasia dei ventricoli cerebrali (Di Guardo, 2015).

Le lesioni microscopiche, rilevabili esclusivamente a livello di SNC, e, in particolare in corrispondenza dei nuclei telencefalici (*nucleus accumbens septi*), dei nuclei diencefalici (ipotalamici e talamici), del corpo striato, del peduncolo cerebellare, del cervelletto (corteccia e nuclei sottocorticali), del midollo allungato (nucleo motore dorsale del vago), della corteccia cerebrale (incostantemente) e del midollo spinale, risultano variabili per intensità e distribuzione. Tali lesioni, ripartite generalmente in maniera bilaterale e simmetrica, sono rappresentate da degenerazione spongiforme della sostanza grigia e, in minor misura, della sostanza bianca, nonché da degenerazione con conseguente perdita neuronale, spongiosi del neuropilo ed, infine, da astrogliosi/astrocitosi e presenza di depositi immunohistochemicalmente evidenti di PrP^{Sc} (Landini & Di Guardo, 2013; Di Guardo, 2015).

Alcuni studi condotti nella specie murina all'inizio degli anni '80 avevano rivelato che le suddette lesioni microscopiche interesserebbero principalmente la corteccia cerebrale e l'ippocampo (Scott & Fraser, 1984). Sono state descritte, successivamente, lesioni a carattere spongiforme a livello prosencefalico, cerebellare e della sostanza bianca (Carp et al., 1998).

La spongiosi o degenerazione ("*spongiform degeneration*") costituisce la lesione più caratteristica osservabile in corso di TSE (Fig. n. 16). Essa si caratterizza come un processo di vacuolizzazione neuronale, che comporta un'alterazione spongiforme del neuropilo della sostanza grigia, fenomeno che può variare dalla presenza di piccoli focolai disseminati a spongiosi diffusa. Il suo riscontro è particolarmente utile ai fini diagnostici,

mentre la valutazione della sua intensità in una serie predeterminata di aree del SNC, attraverso l'assegnazione di uno specifico punteggio ("score") per ogni area presa in considerazione, costituisce un'importante premessa per lo studio del cosiddetto "profilo neuro-istolesivo", indispensabile a sua volta al fine di poter classificare i vari ceppi di agente delle TSE. Nella Scrapie ovina, la vacuolizzazione neuronale e la spongiosi si possono rinvenire talvolta associate ad altre alterazioni regressive quali la coartazione, l'iperbasofilia citoplasmatica, la cromatolisi centrale e la necrosi neuronale. Esse si riscontrano pressoché costantemente a livello di nucleo motore dorsale del nervo vago (DMNV), nonché della formazione reticolare e dei nuclei vestibolare mediale, cuneato laterale e palloniforme. Le indagini ultrastrutturali hanno confermato che tali lesioni coinvolgono gli elementi neuronali nel loro complesso (pirenoforo, assoni, dendriti) ed in minor misura le cellule gliali. La spongiosi si manifesterebbe con maggiore frequenza a carico della sostanza grigia cerebrale sotto forma di vacuoli di piccole dimensioni (1-2 μm), di forma tondeggianti od ovalare, che tendono a confluire tra di loro dando origine a strutture di grandezza maggiore ($\geq 50 \mu\text{m}$), presentandosi come caratteristici aggregati "morula-like" all'interno del neuropilo. I vacuoli intra-citoplasmatici possono presentare margini netti, essere singoli o multipli, a volte eccentrici e spesso otticamente vuoti, eccezion fatta per la presenza al proprio interno di alcuni granuli acidofili che rappresentano accumuli di frammenti di membrane plasmatiche in degenerazione. È utile ricordare che la distribuzione della spongiosi e la sua intensità sarebbero direttamente correlate al ceppo di agente responsabile e al genotipo dell'ospite, oltre che alla durata del periodo d'incubazione. Tali fattori sarebbero in grado di influenzare, in maniera più o meno importante, anche l'entità della stessa astrogliosi/astrocitosi, nonché la topografia, le modalità di trasporto e la successiva deposizione di PrP^{Sc} a livello del tessuto cerebrale (Liberski & Ironside, 2004; Landini & di Guardo, 2013; Di Guardo, 2015). La spongiosi della sostanza bianca, evidenziabile solamente tramite indagini ultrastrutturali, prenderebbe origine dalla dilatazione palloniforme dei dendriti neuronali e, dalla contemporanea vacuolizzazione del pericario. Al microscopio elettronico si osservano, inoltre, processi di vacuolizzazione degli assoni centrali dotati di guaina mielinica, con vacuoli che si presentano sia nell'assoplasma che nella guaina mielinica (edema intramielinico). Ulteriori danni ultrastrutturali sono costituiti dalla presenza di membrane

proliferanti a carico del pericario neuronale, descritte come formazioni “a bulbo di cipolla”, nonché da strutture tubulo-vescicolari accorpanti mitocondri e corpi multivescicolari, negli assoni e nei dendriti. Un altro reperto molto frequente in corso di Scrapie sperimentale nel criceto (ceppo 263K), così come in alcune TSE umane, seppur di più raro riscontro in corso di Scrapie sperimentale murina, è inoltre costituito dalla presenza di depositi extracellulari di PrP^{Sc} sotto forma di placche (placche amiloidee), nonché dalla presenza di depositi perivasali di PrP^{Sc} (angiopatia amiloide cerebrale) (Roberts & Clinton, 1992; Liberski & Ironside, 2004; Di Guardo, 2015).

Nella Scrapie “atipica” il quadro neuro-istolesivo si presenta in maniera diversa rispetto alle lesioni osservate in corso di Scrapie classica. In particolare, la spongiosi risulta ben evidente nel cervelletto e nella corteccia cerebrale, mentre è assente nel tronco encefalico in particolare a livello di *obex* e di NMDV (Benestad et al., 2003; 2008).

L'immunoistochimica ha rivelato, successivamente, che l'accumulo di PrP^{Sc} si manifesta attraverso un'estesa deposizione a livello degli strati molecolare e granulare cerebellari, mentre la sostanza bianca mostra un elevato numero di immunodepositi sparsi associati alle fibre assionali ed al citoplasma oligodendrogliale. Queste caratteristiche forme di accumulo della PrP^{Sc} risultano in netto contrasto con quelle osservate nella Scrapie classica in cui i depositi risultano essere prevalentemente “subpiali”, nonché a morfologia “stellata” e a localizzazione “perivacuolare” (Jeffrey et al., 2016). In uno studio del 2010 in cui si dimostrava la probabile coesistenza, nella specie ovina, della Scrapie “classica” e “atipica” (*Nor98*), il “*pattern*” neuro-istolesivo era caratterizzato dalla presenza di lesioni tipiche della Scrapie “classica” e della Scrapie “atipica” (Mazza et al., 2010).

Per quanto riguarda la morfopatogenesi delle suddette lesioni a livello di SNC, la PrP^{Sc}, nel corso del processo neuroinvasivo, penetrerebbe all'interno dei neuroni e, in minor misura, negli astrociti e nelle cellule microgliali. In particolare, le cellule microgliali sarebbero colonizzate dall'agente prionico grazie al legame con uno specifico recettore (“*Receptor for Advanced Glycation End-products*”, RAGE), con conseguente formazione di specie reattive dell'ossigeno (“*Reactive Oxygen Species*”, ROS) e sviluppo del processo neurodegenerativo che inevitabilmente caratterizza tutte le malattie prioniche animali ed

umane. Il ruolo delle cellule microgliali nella patogenesi delle lesioni, tuttavia, appare controverso. Alle stesse cellule è infatti contestualmente attribuita una funzione difensiva nei confronti di numerose malattie neurodegenerative. Ciononostante, una volta penetrata all'interno delle suddette cellule, la PrP^{Sc} si andrebbe a localizzare nelle membrane delle cisterne dell'apparato del Golgi, situate tra la sede di sintesi e le vie di escrezione delle proteine. In tale distretto la PrP^C originante dalla membrana cellulare interagirebbe con la PrP^{Sc} e, quindi, a discapito della riserva di PrP^C, si formerebbe PrP^{Sc} che si accumulerebbe in maniera esponenziale a livello intracellulare. Questa particolare forma di "auto-replicazione" dell'agente sarebbe la causa diretta della vacuolizzazione neuronale. La PrP^{Sc} si accumulerebbe, inoltre, nei lisosomi, causando una dispersione del loro contenuto nel citoplasma, con conseguente sviluppo delle alterazioni vacuolari. La base biochimica di questa alterazione risiederebbe in un'attivazione diretta o indiretta di un canale ionico per il calcio (Ca²⁺) quali l'N-metil-D-aspartato (NMDA). Ciò provocherebbe l'aumento della concentrazione di ioni Ca²⁺ nel citoplasma neuronale, conseguente incremento dell'osmolarità cellulare e rigonfiamento idropico-vacuolare che è alla base della degenerazione spongiforme. Inoltre, l'ingresso di ioni Ca²⁺ all'interno della cellula potrebbe determinare l'attivazione del processo apoptotico, fenomeno attraverso cui avverrebbero, sia *in vivo* che *in vitro*, il danno regressivo e la conseguente perdita neuronale in corso di TSE, così come di altre patologie neurodegenerative quali ad esempio il morbo di *Alzheimer* (Di Guardo & Agrimi, 1993; Forloni et al., 1996; Chiesa et al., 2005;). In tale contesto si colloca uno studio del 2007 in cui viene valutata la correlazione positiva esistente tra l'accumulo di PrP^{Sc} a livello di determinate aree encefaliche e l'attivazione dell'apoptosi attraverso modificazioni nell'espressione dei geni *Bax* e *Bcl-2* in pecore affette da Scrapie naturale. Viene dimostrata, nel suddetto lavoro, la sovraespressione del gene *Bax* conseguente al deposito di PrP^{Sc}, ma nonostante questo non viene contestualmente rilevata l'attivazione di enzimi come la caspasi-3, probabilmente per contemporanea presenza di fattori neuroprotettivi (Lyahyai et al., 2007). Tra i fattori potenzialmente neuroprotettivi vi sarebbe l'apporto, mediante la dieta, di alcuni metalli quali rame (Cu⁺⁺) e manganese (Mn⁺⁺). La somministrazione bilanciata di tali elementi avrebbe infatti un effetto protettivo nei confronti dell'apoptosi in topi Scrapie-infetti, senza tuttavia essere in grado di arrestare in maniera definitiva la morte

neuronale (Bolea et al., 2010). Altri esperimenti condotti su animali *Bax-deleti* (*Bax*^{-/-}) non sono stati in grado di confermare il ruolo primario del suddetto gene proapoptotico nei confronti della morte cellulare programmata neuronale in corso di TSE. Infatti, l'inoculazione di topi *Bax*^{-/-} e animali "wild-type" di controllo con il prione della BSE adattato al topo non ha mostrato alcuna differenza significativa in termini di accumulo di PrP^{Sc}, neurodegenerazione, insorgenza della malattia ed evoluzione dei segni clinici, fornendo prove convincenti a sostegno dell'ipotesi che la morte cellulare *Bax*-mediata non fosse coinvolta nella neuropatogenesi del danno cellulare in corso di BSE (Coulpier et al., 2006). Tuttavia, enzimi quali caspasi-3 e caspasi-9 sono stati rinvenuti, contestualmente, nel cervello degli stessi animali *Bax*^{-/-}, suggerendo che l'apoptosi possa verificarsi attraverso meccanismi alternativi nelle TSE animali. La diminuzione del *pool* di PrP^C con conseguente perdita delle sue funzioni biologiche potrebbe essere, secondo alcuni studi, un altro possibile meccanismo alla base del processo neurodegenerativo che si verifica in corso di TSE (Hetz et al., 2003). Tuttavia, ulteriori indagini su topi transgenici (*Prnp*^{-/-}) indicherebbero che la malattia possa non derivare dalla perdita di funzione della PrP^C. Infatti, la delezione permanente o condizionale del gene *Prnp* nei topi non produrrebbe alcun fenotipo patologico (Bueler et al., 1992; Mallucci et al., 2002). Altri studi hanno ipotizzato che alla base del processo neurodegenerativo possa esservi l'autofagia, intesa come un meccanismo protettivo per contrastare l'evoluzione della malattia a livello cellulare. In effetti la presenza di vacuoli autofagici all'interno del citoplasma di neuroni di pazienti affetti da TSE ha suggerito che l'autofagia possa svolgere un ruolo importante nella neurodegenerazione propria delle malattie prioniche e che possa al contempo contribuire alla genesi di quelle alterazioni spongiformi presenti nelle TSE (Liberski et al., 2008; Moreau et al., 2010). L'apoptosi e l'autofagia neuronale, inoltre, non si escluderebbero a vicenda, ma potrebbero essere due facce della stessa medaglia (Lee, 2009).

È utile sottolineare tuttavia, che anche se la morte cellulare e la degenerazione spongiforme sono elementi cardinali delle malattie prioniche, i primi cambiamenti rilevabili sarebbero associati a disfunzioni sinaptiche eventualmente indotte dall'accumulo di PrP^{Sc}, sia a livello centrale che a livello di giunzioni neuromuscolari,

disfunzioni che comparirebbero molto precocemente rispetto ai segni di morte neuronale (Jeffrey et al., 2000; Sisková et al., 2009). Nelle fasi iniziali della malattia, la PrP^{Sc} si accumulerebbe all'interno del doppio strato lipidico di membrana dei neuroni, interagendo con alcune proteine implicate nei processi di neurotrasmissione quali caveolina e sinaptofisina, ed influenzando in tal modo l'attività sinaptica (Russelakis-Carneiro et al., 2004). Anche in altre malattie neurodegenerative associate all'accumulo intracerebrale di proteine "anomale", le fasi iniziali della malattia sarebbero legate alla disfunzione sinaptica piuttosto che alla perdita neuronale (Selkoe, 2002; Mallucci, 2009). La disfunzione sinaptica sarebbe seguita da una perdita dendritica, con entrambe le alterazioni precedenti la morte neuronale (Fuhrmann et al., 2007). Le succitate perdite dendritiche sarebbero pertanto correlate con la degenerazione spongiforme nelle fasi iniziali della malattia prioniche.

L'astrogliosi rappresenta di fatto un processo iperplastico che coinvolge gli astrociti e che caratterizza tutte le malattie da prioni, così come altre malattie neurodegenerative umane come il morbo di Alzheimer. Gli astrociti iperplastici sono costantemente presenti in tutte le aree cerebrali in preda a spongiosi e possono altresì mostrare un'iperbasofilia citoplasmatica come conseguenza dell'accumulo di glicogeno al loro interno. Possono essere messi in evidenza mediante tecniche di impregnazione argentea (esempio colorazione di *Cajal*), oppure mediante indagini immunoistochimiche, mediante l'utilizzo di anticorpi nei confronti della proteina fibrillare acida gliale (Liberski & Ironside, 2004; Di Guardo, 2015).

L'astrocitosi è invece un processo ipertrofico il quale potrebbe essere conseguente all'astrogliosi. Un quesito importante a tal proposito riguarda la possibilità che l'attivazione gliale (astrocitosi/astrogliosi) sia innescata dall'accumulo di PrP^{Sc} direttamente, o piuttosto dalla degenerazione neuronale dovuta alla replicazione dei prioni. In primo luogo è utile sottolineare che l'attivazione astrocitaria sembra essere mediata da alcune citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina 1 (IL-1), attraverso il legame con uno specifico recettore chiamato CXCR-3 (Burwinkel et al., 2004); in secondo luogo alcuni studi in passato hanno rivelato che i geni associati all'ipertrofia/iperplasia delle cellule gliali sarebbero iper-espressi dopo che un quantitativo apprezzabile di PrP^{Sc}

sarebbe rilevabile nel cervello, ma ben prima che qualsiasi segno di malattia o danno neuronale risulti evidente (Hwang et al., 2009). Questi risultati suggerirebbero pertanto che l'astrogliosi/astrocitosi possa rappresentare una risposta diretta all'accumulo di PrP^{Sc}.

Nei casi di malattia in cui il decorso risulti essere particolarmente lungo, la perdita neuronale con annessa gliosi astrocitaria sarebbero talmente intense da mascherare la spingiosi. Per questo motivo, alcuni Autori in passato hanno proposto la distinzione tra “*spongiform change*” (degenerazione spongiforme) e “*status spongiosus*” (stato spongioso) (Masters & Richardson, 1978). Quest'ultimo consisterebbe nella comparsa di ampie cavità irregolari all'interno del neuropilo, interposte tra una fitta rete di astrociti in attiva proliferazione. Lo “*status spongiosus*” non è da considerarsi specifico delle malattie da prioni, ma si può osservare anche in corso di altre malattie neurodegenerative caratterizzate da intensa perdita neuronale (Liberski & Ironside, 2004).

A tal proposito è utile sottolineare che nell'ambito della medicina umana esistono almeno una dozzina di proteine, fisiologicamente presenti nell'organismo, che condividono caratteristiche morfologiche, strutturali e biochimiche con i prioni. Numerosi studi hanno evidenziato che l'accumulo di forme mal ripiegate (*misfolded*) di tali proteine, provocherebbe diverse malattie neurodegenerative, come ad esempio il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), il morbo di Huntington, le Atassie Spinocerebellari (AS) e le Taupatie (Soto & Satani, 2011; Prusiner, 2013). Sebbene queste neuropatie si differenzino dalle TSE per una serie dicaratteristiche cliniche e patologiche, sarebbero tuttavia accomunate alle TSE dal meccanismo patogenetico di base, vale a dire l'aggregazione ed il successivo accumulo di proteine “anomale” come causa di malattia (Walker & Jucker, 2015).

Le principali proteine individuate fino ad ora sono: la proteina APP, la proteina Tau, l' α -sinucleina, la superossido-dismutasi 1 (SOD1) e l'Huntingtina. Ognuna di queste proteine ha la capacità di aggregarsi in fibrille in determinate condizioni e formare placche amiloidi, presentando forti analogie con quanto avviene in corso di TSE. Le patologie che ne derivano sono definite Malattie Neurodegenerative Sporadiche (NDS), poichè la maggior parte sono appunto di natura sporadica e solo il 10-20% sono ereditarie. Questo

vale per CJD, AD, PD, Taupatie e SLA, ma non per il Morbo di Huntington, che invece è esclusivamente ereditario (Prusiner, 2013). Attualmente, queste proteine non possono essere definite veri e propri prioni, poiché presentano molte caratteristiche comuni, ma anche una serie di differenze rispetto alla PrP^C come ad esempio la loro incapacità di essere trasmissibili in condizioni naturali. Non essendo possibile catalogarle come prioni, sono state denominate “*prionoidi*”(Verma, 2016).

Il deposito e l’accumulo di sostanza amiloide che contraddistingue tutte le TSE umane ed animali consiste nella progressiva deposizione di PrP^{Sc} a livello di SNC ma anche in una serie di altri distretti extra-cerebrali. In corso di Kuru, vCJD, BASE, nonché nei modelli di Scrapie murina si osserva frequentemente il deposito di placche amiloidi in sede extracellulare. La presenza di sostanza amiloide può essere dimostrata mediante l’utilizzo di idonee tecniche istochimiche (rosso Congo), immunoistochimiche e ultrastrutturali. Le placche amiloidi presentano una conformazione tipica, essendo costituite, nello specifico, da un *core* congofilo e immunoreattivo nei confronti degli anticorpi anti-PrP^{Sc}, circondato a sua volta da neuriti distrofici. La morfologia esatta delle suddette placche varia però fra i diversi tipi di TSE. Ad esempio, nel Kuru esse sono formate da un *core* stellato e da un numero ridotto di neuriti distrofici, mentre nella GSS le placche appaiono multicentriche e nella vCJD appaiono circondate da un alone di spongiosi (cosiddette “*placche floride*”), risultando altresì presenti nella corteccia cerebrale e cerebellare (Liberski & Ironside, 2004). Nella Scrapie ovina, il deposito di sostanza amiloide varia consistentemente a seconda della razza considerata, del genotipo, nonché del ceppo di agente in questione. In uno studio del 2004 è stata dimostrata la presenza di sostanza amiloide in sede perivascolare, in particolare nel talamo e nel mesencefalo (Ligios et al., 2004).

Fino a poco tempo fa le uniche lesioni dimostrabili in corso di TSE interessavano il SNC; sappiamo tuttavia che i prioni possono accumularsi in grandi quantità in altri distretti anatomici, come per esempio nei tessuti linfatici dell’ospite. Uno studio di McGovern (2007) ha dimostrato altresì che, in corso di Scrapie, le FDCs residenti in sede splenica subirebbero una serie alterazioni microscopiche (McGovern et al., 2007).

Più recentemente, alcune indagini ultrastrutturali effettuate su topi infettati con l'agente della Scrapie hanno dimostrato la presenza di sostanza amiloide in tessuti extra-neurali, tra cui cuore, grasso bruno, grasso bianco e colon. I depositi di PrP^{Sc} identificati erano osservabili, anche intorno ai vasi sanguigni a livello di tessuto cardiaco, grasso bruno, grasso bianco, colon e tessuti linfoidei. Microscopicamente, la deposizione di PrP^{Sc} era presente all'esterno e all'interno delle membrane plasmatiche degli adipociti del grasso bruno e nei cardiomiociti, ove la stessa sembrava provocare invaginamenti e distruzione delle membrane plasmatiche di questi tipi cellulari. Al contrario, nessun danno cellulare appariva evidentemente associato ai macrofagi dei tessuti linfoidei e del colon, nonché alle cellule gangliari neuronali enteriche del colon e agli adipociti del grasso bianco (Race et al., 2017).



Fig. n. 12: Ovino affetto da Scrapie. Si possono osservare intense aree alopeciche nelle regioni del collo, torace e fianco destro come conseguenza del grattamento (<http://coloradodisasterhelp.colostate.edu/prefair/disease/dz/Scrapie.html>)



Fig. n. 15: Ovino affetto da Scrapie. Si nota la presenza di estese aree alopeciche diffuse a livello di spalla, torace e tronco dell'animale, unitamente ad una zona di erosione cutanea con perdita di sostanza in prossimità della regione dell'anca come conseguenza del grattamento (<http://academics.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/aspirin/1mouton%20Scrapie.jpg>).

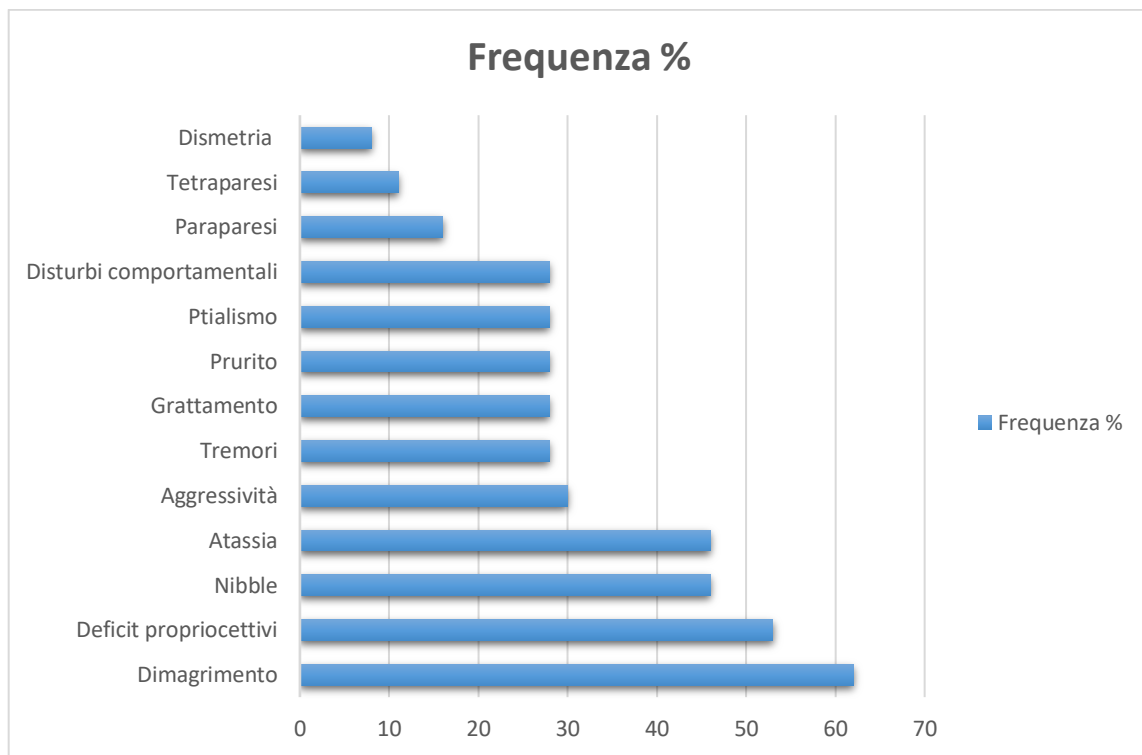


Fig. n. 14: Frequenza dei sintomi più comunemente osservabili in corso di Scrapie. Vengono mostrati solo i valori percentuali superiori al 7% (D'Angelo et al, 2007, modificato).



Fig. n. 13: Ovini di razza Sarda affetti da Scrapie. In alcuni soggetti è possibile osservare la presenza di disturbi comportamentali riferibili a uno stato stuporoso (“*star gazing*”) (Di Guardo, 2015).

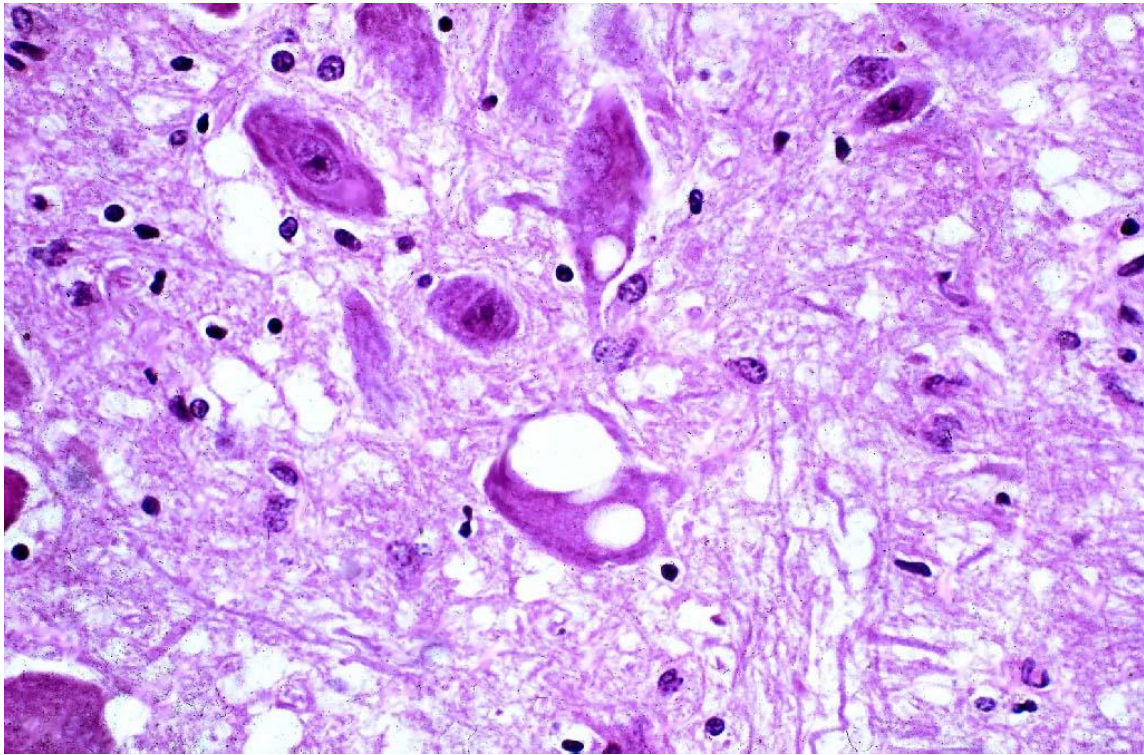


Fig. n. 16: Scrapie. Pecora. Evidente vacuolizzazione neuronale e spongiosi del neuropilo in sede cerebrale. Colorazione con ematossilina-eosina (Di Guardo, 2015).

1.2.3 Patogenesi e ruolo del sistema nervoso autonomo

Tra gli obiettivi principali che la ricerca scientifica ha perseguito nel tempo relativamente allo studio delle TSE, vi è sicuramente quello relativo alla caratterizzazione della complessa sequenza patogenetica dell'infezione a partire dal primo contatto che il prione realizza con l'organismo ospite, fino alla cosiddetta "neuroinvasione", vale a dire quel lungo viaggio che lo porterà a colonizzare il SNC dello stesso (Aguzzi & Polymenidou, 2004; Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Mabbott & MacPherson, 2006).

Come più volte precisato in precedenza, le vie di ingresso dei prioni all'interno di un organismo ospite possono essere molteplici, per quanto la via orale rappresenti sicuramente, in corso di infezione naturale, la principale porta di accesso per questo tipo di agenti patogeni, come peraltro confermato da numerosi studi sperimentali effettuati su roditori e su animali domestici (Mabbott, 2017).

A tal proposito, numerosi studi sperimentali condotti in passato, hanno dimostrato che il sistema nervoso enterico (*Enteric Nervous System*, ENS) svolgerebbe, unitamente alle placche del Peyer (*Peyer's patches*, PPs), un ruolo fondamentale nelle fasi precoci dell'infezione in corso di molte TSE, come per esempio, nella vCJD dell'uomo (Hilton et al., 1998), nella Scrapie ovina (van Keulen et al., 1999; 2002; 2008; Androletti et al., 2000; Heggebø et al., 2003a; 2003b; Aguzzi & Polymenidou, 2004; Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Mabbott & MacPherson, 2006; Ryder, 2009; Demonceau et al., 2014), nella Scrapie sperimentale dell'*hamster* (Beekes M & McBride PA, 2000; 2007) e nella CWD dei cervidi (Sigurdson et al., 2001).

In effetti, dopo l'infezione orale e prima di colonizzare il SNC, i prioni tendono a localizzarsi a livello dei tessuti linfatici dell'ospite; questo dato è comune a molte TSE ed è stato ampiamente documentato in corso di Scrapie ovina (van Keulen et al., 1996; 2000; 2008; Heggebø et al., 2000; 2002; Ersdal et al., 2003; 2005; Chiocchetti et al., 2008; Ryder et al., 2009; Demonceau et al., 2014), nonché di encefalopatia spongiforme trasmissibile del visone (*transmissible mink encephalopathy*, TME) (Hadlow et al., 1987) e vCJD dell'uomo (Hilton et al., 1998).

I prioni possono persistere nei tessuti linfatici dell'ospite per tutta la durata dell'infezione, sebbene ciò sia ampiamente influenzato dalla specie in questione, nonché dal ceppo di agente responsabile. Ad esempio, in corso di BSE l'accumulo di PrP^{Sc} all'interno delle PPs di bovini infetti sarebbe molto limitato, mentre sarebbe molto significativo nei tessuti linfatici di pazienti umani affetti da vCJD e di ovini sperimentalmente infetti (Foster et al., 2001b; Wadsworth et al., 2001; Terry et al., 2003). Si possono osservare differenze significative anche all'interno di una popolazione di animali appartenenti alla stessa specie. Ligios et al (2006) hanno dimostrato, mediante indagini immunostochimiche ed immunobiochimiche effettuate su un elevato numero di capi, che la presenza di PrP^{Sc} nei tessuti linfatici si attesterebbe su percentuali diverse a seconda dello stadio dell'infezione, risultando più elevata nella fase pre-clinica (26%) ed ancor più modesta nella fase sintomatica (6%) (Ligios et al., 2006). Inoltre, in alcuni casi, i polimorfismi del gene *PRNP* influenzerebbero la distribuzione della PrP^{Sc} nei tessuti linfatici dell'ospite in corso di Scrapie ovina (Jeffrey et al., 2002; Benestad et al., 2003) e di sCJD (Glatzel et al., 2003).

A seguito dell'infezione *per os*, l'agente della Scrapie tende ad accumularsi nel tessuto linfatico associato all'intestino (*gut-associated lymphoid tissues*, GALT) (Prinz et al., 2003; Horiuchi et al., 2006). Il GALT comprende una raccolta di strutture multifollicolari, tra cui le tonsille palatine, le placche del *Peyer*, l'appendice vermiforme del cieco, le placche del colon e del cieco e un numero di piccole strutture follicolari denominate follicoli linfatici isolati (*Isolated Lymphoid Follicles*, ILFs). Questi tessuti sono localizzati nell'intero tratto gastrointestinale (*Gastrointestinal Tract*, GIT) e, insieme ai linfonodi mesenterici, aiutano a proteggere l'ospite dalle infezioni. Gli ILFs nell'intestino possono essere classificati come ILFs immaturi (singoli follicoli con cellule B primarie) o ILFs maturi, contenenti un singolo centro germinativo ospitante a sua volta linfociti B organizzati ed una rete di cellule specializzate denominate cellule follicolari dendritiche (*Follicular Dendritic Cells*, FDCs) (Glaysher & Mabbott, 2007; Donaldson et al., 2015). Alcuni studi hanno dimostrato che gli ILFs maturi contenenti FDCs costituirebbero nuovi, precedentemente non riconosciuti, siti intestinali di replicazione prionica precedente la neuroinvasione. Infatti, topi che manchino di strutture organizzate come le PPs, ma che

alberghino al contempo numerosi ILFs contenenti FDCs in tutto il loro intestino mostrerebbero patogenesi e suscettibilità nei confronti delle malattie prioniche inalterate a seguito di esposizione orale rispetto ai controlli (Glaysher & Mabbott, 2007).

I prioni si accumulano sia nel GALT del piccolo intestino che a livello tessuto linfoide associato al grosso intestino, come a livello del tessuto linfoide associato alla mucosa retto-ale (Recto-anal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, RAMALT). L'accumulo della PrP^{Sc} all'interno del RAMALT nelle specie affette da Scrapie e CWD (González et al., 2006; Wolfe et al., 2007) nonché in sede tonsillare ed in corrispondenza dell'appendice cecale di pazienti umani affetti da vCJD, ha ricevuto un'attenzione significativa poiché è stato usato per identificare gli animali infetti nello stadio preclinico della malattia e per ottenere informazioni sulla possibile prevalenza della vCJD nel Regno Unito (Hilton et al., 2004; Gill et al., 2013). È importante sottolineare, a questo proposito, che in corso di infezione naturale (orale), l'accumulo di prioni a livello di RAMALT risulterebbe secondario rispetto al coinvolgimento del GALT del piccolo intestino (van Keulen et al., 2000; Thomsen et al., 2012; Donaldson et al., 2015).

A dimostrazione di ciò, numerosi studi hanno evidenziato, in passato, un aumento dell'infettività a livello dell'ileo distale (van Keulen et al., 1996), nonché un accumulo precoce di PrP^{Sc} a carico dei noduli linfatici isolati presenti sia nel GIT che nelle tonsille (Mabbott et al., 2006; Ryder et al., 2009). Questi accumuli sarebbero accompagnati da contemporanei fenomeni di replicazione locale del prione e dalla successiva diffusione ai follicoli linfatici adiacenti (Ryder et al., 2009). La successiva diffusione ai distretti linfatici più distanti dal GIT farebbe presupporre che la diffusione linfo-ematogena possa giocare un ruolo importante nella patogenesi dell'infezione (Ryder et al., 2009).

Dopo esposizione orale i prioni colonizzano i linfonodi mesenterici (Huang et al., 2000; Houston et al., 2016). Nonostante ciò l'assenza degli stessi non influenzerebbe il processo neuroinvasivo o la suscettibilità alla malattia (Glaysher & Mabbott, 2007; Donaldson et al., 2015; 2016). Ciò implica che la carica infettante che inizialmente colonizza i linfonodi mesenterici subito dopo l'esposizione orale non sarebbe sufficiente, da sola, per stabilire un efficace processo di neuroinvasione. La condizione necessaria e sufficiente affinché

ciò si verificasse sarebbe invece, l'accumulo e la moltiplicazione dell'agente prionico all'interno delle FDCs del GALT del piccolo intestino. Coerentemente con la conclusione che il GALT del tratto gastrointestinale superiore sia il sito essenziale dell'accumulo dei prioni e della neuroinvasione dopo l'esposizione orale, anche l'assenza della milza non influenzerebbe la patogenesi o la suscettibilità alla malattia nel topo (Kimberlin et al., 1989; Bradford et al., 2017).

I molteplici studi condotti nel corso degli anni ci consentono attualmente di affermare che a seguito dell'esposizione orale, l'accumulo precoce e la replicazione dei prioni all'interno delle FDCs residenti nel GALT, in particolare a livello di PPs, sarebbero essenziali per un'efficace neuroinvasione (Andreoletti et al., 2000; Aguzzi, 2003; Mabbott et al., 2003; Prinz et al., 2003; Aguzzi & Polymenidou, 2004; Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Mabbott & McPherson, 2006; van Keulen et al., 2008; Ryder et al., 2009; Donaldson et al., 2015).

Affinchè l'agente della Scrapie possa invadere le suddette strutture linfatiche, è condizione necessaria l'attraversamento dell'epitelio della mucosa intestinale. Le cellule epiteliali intestinali, infatti, sono dotate di specifiche giunzioni serrate (*tight junctions*) che costituiscono fisiologicamente una solida barriera nei confronti di qualsivoglia *noxa* patogena.

Riteniamo utile in questo momento, prima di procedere con la descrizione del processo evolutivo-patogenetico che culminerà con la neuroinvasione, descrivere brevemente le caratteristiche istologiche che riguardano le placche del Peyer, (PPs). Le PPs sono costituite da noduli linfatici situati nella sottomucosa, attorno ai quali si distribuisce uno strato di linfociti B. La regione internodulare è ricca di linfociti T e di venule post-capillari. Al di sopra dell'epitelio follicolo-associato (*Follicle Associated Epithelium*, FAE), che riveste i suddetti noduli linfatici, è presente la *Dome Area*. I noduli linfatici sono costituiti da un centro germinativo che ospita al suo interno linfoblasti B, FDCs, macrofagi e linfociti T (Dellmann & Eurell, 2005).

Il FAE che riveste le PPs contiene una popolazione unica di cellule epiteliali fagocitarie (*Microfold Cells*, cellule M). Queste cellule sono specializzate per la transitosi di antigeni particellari e microrganismi dal lume intestinale nel GALT (Mabbott et al., 2013).

Numerosi studi supportano l'ipotesi che anche i prioni, come molti altri agenti patogeni, possano sfruttare la capacità di trasporto transepiteliale delle cellule M per attraversare la barriera mucosale intestinale e raggiungere le PPs sottostanti (Heppner et al., 2001; Miyazawa et al., 2010; Takakura et al., 2011; Donaldson et al., 2012, 2016). Alcuni Autori, mediante studi *in vitro*, hanno dimostrato che l'accumulo di prioni nel GALT e la suscettibilità alla malattia dopo esposizione orale risulterebbero entrambi ridotti nei topi privi di cellule M o nei topi in cui le cellule M siano state transitoriamente "inattivate" prima dell'infezione (Donaldson et al., 2012; 2016). Altri studi che hanno utilizzato ceppi di Scrapie adattati al topo (Heppner et al., 2001), nonché l'agente della BSE adattato alla specie murina (Miyazawa et al., 2010), oltre ad infezioni sperimentali nell'*hamster* (Beekes et al., 2000), indicano che le cellule M svolgerebbero un ruolo importante nel passaggio della PrP^{Sc} attraverso l'epitelio intestinale.

Vi è da notare, tuttavia, che questi studi ad oggi non hanno ancora trovato conferma *in vivo* e che esisterebbero meccanismi alternativi di captazione dei prioni dal lume intestinale che prevedono la possibilità, da parte degli stessi, di essere complessati con la ferritina e di subire un processo di transitosi mediato dagli enterociti (Mishra et al., 2004). Altre ipotesi chiamerebbero in causa le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DCs) le quali potrebbero fagocitare i prioni direttamente nel lume enterico inserendo i propri prolungamenti citoplasmatici tra le *tight junctions* dell'epitelio intestinale (Fig. n. 17) (Rescigno et al., 2001; Mabbott et al., 2017). Pertanto, come alcuni altri agenti patogeni, i prioni potrebbero anche sfruttare la DCs per stabilire l'infezione, magari utilizzandole come "cavalli di Troia". Tale ipotesi sarebbe supportata dall'osservazione che alcune DCs migranti dall'intestino nella linfa mesenterica afferente acquisirebbero la PrP^{Sc} dopo la sua inoculazione nel lume intestinale (Huang et al., 2002).

Altre teorie chiamano in gioco le cellule entero-endocrine quali possibili elementi in grado di trasportare i prioni attraverso la parete intestinale poiché tali cellule esprimono livelli di PrP^C paragonabili a quelli dei neuroni dell'ENS, cosa che renderebbe quindi plausibile un loro ruolo nella replicazione primaria del prione (Davies et al., 2006; Ryder et al., 2009).

Tra tutte le diverse popolazioni cellulari potenzialmente coinvolte nella patogenesi delle TSE, quelle che avrebbero un ruolo cruciale sono rappresentate dalle FDCs, che risultano essere numerose nei follicoli linfatici primari e nei centri germinativi dei tessuti linfatici (Jeffrey et al., 2000). È obbligatorio a questo punto fare le dovute distinzioni tra le FDCs e le DCs. Tra le due linee cellulari esistono, infatti, profonde differenze sia per quanto riguarda l'origine, sia dal punto di vista morfologico e funzionale. Le DCs hanno derivazione mieloide, sono mobili, svolgono attività fagocitaria e rientrano nella sottoclasse delle “cellule presentanti l'antigene” (*Antigen Presenting Cells*, APC) (Poli et al., 2005). Le FDCs, invece, derivano da un precursore stromale (Ksaspassi et al., 1993), sono immobili e non svolgono attività fagocitaria (Shortman et al., 2002; Mabbott et al., 2011; Krautler et al., 2012). Le FDCs esprimono alti livelli di PrP^C (Klein et al., 1998; Brown et al., 1999, 2012; McCulloch et al., 2011) e questo permette loro di accumulare PrP^{Sc}. Nei topi transgenici, resi incapaci di esprimere la PrP^C a livello delle sole FDCs, la progressione dell'infezione risulterebbe infatti totalmente inibita, unitamente alla replicazione del patogeno e di fatto, risulterebbe notevolmente ritardata la neuroinvasione (Mabbott et al., 2000b, 2003; Mohan et al., 2005; McCulloch et al., 2011).

Dal punto di vista morfologico, le FDCs sono dotate di processi dendritici sottili che si estendono in tutto il follicolo tra le cellule B. Questi dendriti consentono alle FDCs di intrappolare e trattenere grandi quantità di antigeni nativi sulle loro superfici sotto forma di immunocomplessi, costituiti da complessi antigene-anticorpi e/o composti opsonizzati dal complemento. La membrana plasmatica delle FDCs è inoltre dotata di recettori specifici per la frazione costante delle immunoglobuline (Fc) e per alcune componenti del complemento (*Complement Receptor Type 1*, CR1; *Complement Receptor type 2*, CR2). Questa complessa organizzazione morfologica e funzionale consente loro di captare e trattenere complessi macro-molecolari (van der Berg et al., 1995; Klein et al., 2001). Il confronto dei contributi relativi dei recettori CR1 e CR2 ha rivelato un ruolo più importante per il CR2 nella patogenesi delle malattie da prioni (Kane et al., 2017).

Altre componenti del complemento quali il fattore C1q e il fattore proteico regolatorio H possono legarsi alla PrP^{Sc} (Mitchell et al., 2007 ; Sim et al., 2007). L'assenza specifica di componenti opsonizzanti del complemento (C1q, C2, C3, C4 e fattore H) o di espressione

del CR2 sulle FDCs impedirebbe altresì l'accumulo di prioni nei tessuti linfatici della milza e ne ritarderebbe la neuroinvasione (Mabbott et al., 2001; Klein et al., 2001; Zabel et al., 2007; Michel et al., 2012, 2013).

Gli immunocomplessi che vengono trattenuti dalle FDCs sarebbero inizialmente internalizzati prima di subire ripetuti cicli di “visualizzazione” sulla superficie cellulare (Heesters et al., 2013). Questa modalità ciclica di espressione del complesso immunitario aiuterebbe a proteggere gli antigeni dalla degradazione, consentendo loro di essere trattenuti per periodi molto più lunghi (Heesters et al., 2014). Nonostante ciò, analisi immunoistochimiche ad alta risoluzione indicano che la replicazione del prione si verificherebbe sulla superficie delle FDCs, poiché la PrP^{Sc} non è stata rilevata al loro interno (Jeffrey et al., 2000; Sigurdson et al., 2002; McGovern et al., 2004, 2009; Kujala et al., 2011).

Anche altre popolazioni cellulari facenti parte del GALT prendono parte in maniera significativa al processo neuroinvasivo. È il caso specifico dei “macrofagi a corpo tingibile” (*Tingible Body Macrophages*, TBM), cellule residenti specificamente all'interno dei centri germinativi dei follicoli linfatici. Questi macrofagi sono caratteristicamente sovraccarichi di resti di linfociti apoptotici fagocitati (corpi tingibili) e durante la malattia prionica contengono anche consistenti accumuli di PrP^{Sc} all'interno dei loro compartimenti endosomiali (McGovern et al., 2009; Kujala et al., 2011; McCulloch et al., 2011). Il ruolo patogenetico dei macrofagi in corso di TSE è ancora incerto; alcuni dati suggeriscono che essi possano degradare ed eliminare i prioni nel tentativo di proteggere l'ospite dall'infezione (Carp et al., 1982; Beringue et al., 2000; Maignien et al., 2005; Mabbott & McPherson, 2006) (Fig. n. 18).

Sebbene molto spesso, come precedentemente descritto, la replicazione degli agenti prionici all'interno delle FDCs sia una tappa fondamentale nella patogenesi della malattia, sono stati riportati casi in cui l'accumulo di prioni nel GALT e/o la neuroinvasione si verificherebbero indipendentemente dalle FDCs. I fattori che attribuiscono un ruolo centrale alle FDCs nella patogenesi delle TSE sono incerti, sebbene ciò possa essere influenzato dal ceppo prionico, dalle specie ospiti, dal genotipo *PRNP* e dalla via di

trasmissione/infezione. La dose infettante, per esempio, può influenzare la suscettibilità alla malattia, poiché alte dosi potrebbero “bypassare” l’esigenza di amplificazione negli organi linfoidi secondari (*Secondary Lymphoid Organs*, SLOs) prima della neuroinvasione (Prinz et al., 2002). Il ceppo prionico ed il genotipo *PRNP* dell'ospite possono influenzare, come già detto, la patogenesi della malattia negli ovini (Andreoletti et al., 2000; Heggebò et al., 2002). In altri casi, come per esempio nella CJD sporadica dell'uomo, l'accumulo precoce di prioni nei tessuti periferici, tra cui gli SLOs potrebbe non risultare determinante (Glatzel et al., 2003), così come la suscettibilità del topo al prione della CJD non sarebbe influenzata dall'assenza di linfociti B maturi e di FDCs (Shlomchik et al., 2001). Si ritiene che nella BSE del bovino vi sia un limitato coinvolgimento dello SLOs durante la fase preclinica dell'infezione (Somerville et al., 1997), sebbene la PrP^{Sc} sia stata rilevata nell'intestino tenue della maggior parte degli animali a seguito di infezione sperimentale (per via orale) così come in alcuni bovini dopo esposizione naturale (Wells et al., 1994; Terry et al., 2003; Hoffmann et al., 2011). Tuttavia, quando si realizza la trasmissione della BSE ad altre specie come l'uomo (sotto forma di vCJD), nonché a pecore e topi, l'accumulo di PrP^{Sc} nei tessuti linfoidi costituirebbe un reperto pressoché costante (Hill et al., 1997; Foster et al., 2001; Brown et al., 2014).

In ogni caso l'accumulo di PrP^{Sc} a livello delle FDCs non comporterebbe alcuna alterazione morfologicamente apprezzabile (McCulloch et al., 2011), in quanto - come ben noto - in corso di TSE umane e animali le lesioni sarebbero confinate al SNC (Di Guardo, 2015). Tuttavia, lo studio ultrastrutturale dello SLOs, in corso di malattia, ha rivelato l'esistenza di cambiamenti morfologici a carico delle FDCs. Questi includono cicli di maturazione influenzati negativamente, anomali ripiegamenti dendritici ed eccessivo accumulo di complessi immuni tra i dendriti delle FDCs (McGovern et al., 2004; 2009).

Ulteriori studi hanno dimostrato che altri tipi cellulari potrebbero rivestire un ruolo importante nella patogenesi delle TSE. Assumono particolare importanza, in tale contesto i linfociti B. Tra le tante funzioni svolte da queste cellule del sistema immunitario, quella più importante nel nostro caso è sicuramente la produzione di importanti citochine, quali

le linfofosine di membrana $\alpha 1$ e $\beta 2$ (LT) e il “*tumor necrosis factor α* ” (TNF- α), fondamentali sia nella maturazione che nel mantenimento nello stato differenziato delle FDCs nei centri germinativi. Infatti, topi “*knockout*”, deprivati dei geni codificanti per LT- α , LT- β , nonché di linfociti B hanno mostrato una ridotta efficienza nella replicazione prionica, in quanto privi di FDCs (Davies et al., 2006).

Dopo aver risieduto nelle PPs, le cellule B migrano verso i linfonodi mesenterici e quindi ritornano in circolo (Schmidt et al., 2013). Le cellule B possono ricircolare tra i tessuti linfoidei per diverse settimane (Turner et al., 1997) e spesso acquisiscono antigeni dalle FDCs mentre migrano attraverso i centri germinativi (Suzuki et al., 2009). Studi su topi hanno suggerito che anche le cellule B circolanti sarebbero coinvolte nella diffusione iniziale dei prioni dai tessuti linfoidei ad altri SLOs. Quando la migrazione delle cellule B tra SLOs viene specificamente bloccata, anche la diffusione dei prioni dall’SLO drenante ad altri SLOs verrebbe stata bloccata (Mok et al., 2012). Se lo stesso si verificasse nelle infezioni naturali è incerto, ma i prioni sono stati rilevati in associazione con linfociti B (Andreoletti et al., 2012; Douet et al., 2016) nel sangue di pecore con Scrapie (Edwards et al., 2010) e di cervi con CWD (Mathiason et al., 2010).

In netto contrasto con quanto avviene nelle infezioni da altri microrganismi patogeni, topi deprivati delle cellule B e delle cellule T mature del sistema immunitario, quali i topi affetti da SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) e i topi Rag-1^{-/-}, Rag-2^{-/-} e Agr^{-/-} risulterebbero refrattari nei confronti delle infezioni prioniche (Kitamoto et al., 1991; Fraser et al., 1994, 1996; Klein et al., 1997). Tuttavia, le cellule T non svolgerebbero affatto un ruolo importante nella patogenesi della malattia da prioni. È stato osservato, infatti, che l’accumulo di prioni negli SLOs e la successiva neuroinvasione non sarebbero compromessi nei topi timectomizzati carenti delle sole cellule T o nei topi transgenici con carenze specifiche delle cellule T (CD4^{-/-}, CD8^{-/-}, $\beta 2\text{-}\mu$ ^{-/-}, TCR α ^{-/-} o Perforina^{-/-}) (McFarlin et al., 1971; Fraser et al., 1978). Le cellule T, inoltre, sembrano mancare dei fattori cellulari necessari per sostenere l’infezione da prioni come l’espressione di alti livelli di PrP^C (Raeber et al., 1999). Nel caso specifico delle cellule B, invece, alcuni studi hanno dimostrato che l’accumulo di prioni nella milza e la successiva neuroinvasione sarebbero entrambi significativamente ridotti in animali deprivati delle

suddette cellule (Klein et al., 1997). Purtroppo, le cellule B non permetterebbero la replicazione prionica, come dimostrato da studi effettuati su topi transgenici che esprimono alti livelli di PrP^C solo sui linfociti B (Montrasio et al., 2001). Ciò indica che le cellule B potrebbero probabilmente svolgere un ruolo indiretto nella patogenesi delle malattie da prioni, forse attraverso la fornitura di supporti omeostatici ad altre popolazioni di cellule.

Poiché la fitta rete costituita dalle FDCs si trova ad una certa distanza dal FAE, così come dai sottostanti plessi dell'ENS, la diffusione dell'agente patogeno dal GALT al SNC, passando proprio attraverso i suddetti plessi, costituirebbe secondo alcuni Autori una fase cruciale nella patogenesi dell'infezione (Beekes et al., 1996; van Keulen et al., 2000; McBride et al., 2001; Sigurdson et al., 2001; Heggebø et al., 2003a; Davies et al., 2006; Ryder et al., 2009).

Le cellule dell'ENS sarebbero le prime cellule nervose, in ordine cronologico, ad essere colonizzate dai prioni in seguito ad infezione orale, dal momento che sia i neuroni che le cellule enterogliali (*Enteroglial Cells*, EGC) residenti in tali distretti esprimono alti livelli di mRNA codificanti per la PrP^C (Ford et al., 2002) e possono altresì albergare PrP^{Sc} (Figg. nn. 19 e 20). L'accumulo di PrP^{Sc} è stato ampiamente dimostrato in corrispondenza dei neuroni dell'ENS immunoreattivi nei confronti della calbindina (CALB), dell'ossido nitrico sintetasi (*neuronal Nitric Oxide Synthase*, nNOS) e della somatostatina (SOM), in corso di scrapie ovina naturale e sperimentale (Marruchella et al., 2007; Schneider et al., 2008).

Nonostante ciò, a livello dei plessi dell'ENS non si realizzerebbe alcun danno neuronale, come invece avviene a carico del SNC (Shmakov et al., 2000; Marruchella et al., 2007; Albanese et al., 2008; Ryder et al., 2009).

Il trasferimento dei prioni dai centri germinativi dei follicoli linfatici verso i plessi dell'ENS avviene con modalità non del tutto note. Tuttavia, è alquanto improbabile che tale diffusione possa realizzarsi direttamente poiché le FDCs occupano sedi anatomiche diverse rispetto alle fibre nervose, sono immobili e solo raramente stabiliscono intime

relazioni sinaptiche (Felten et al., 1992; Defaweux et al., 2005; Marruchella et al., 2009; 2011).

L'innervazione degli organi linfatici, compreso il GALT, è principalmente sostenuta dalla componente adrenergica del sistema nervoso autonomo (SNA). In particolare, l'arborizzazione nervosa dell'ileo è costituita da fibre post-gangliari della catena simpatica paravertebrale e dei nervi splanchnici. Le PPs ricevono fibre nervose provenienti dai gangli mesenterici che, attraversando il peritoneo, formano un plesso i cui rami raggiungono gli spazi interfollicolari e la lamina propria (Felten et al., 1991).

Alcuni studi condotti sull'effettiva innervazione dell'ileo hanno dimostrato che la rete di fibre nervose si localizza per lo più a livello dello stroma interfollicolare e perifollicolare, mentre le fibre intrafollicolari sono piuttosto rare. Non sono state riscontrate, inoltre, differenze significative nella densità delle fibre nervose presenti a livello di PPs di ovini sani rispetto a quelle presenti in ovini di razza Sarda affetti da Scrapie, né tantomeno tra ovini con genotipi (genotipo PrP) differenti (ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARR/ARR). Negli ovini adulti, sia Scrapie-free sia Scrapie-infetti, sono state altresì riscontrate fibre nervose nella *dome area*, in prossimità del FAE. Gli stessi studi hanno infine documentato la presenza di una fitta rete di fibre nervose “tirosin-idrossilasi (TH)-immunoreattive (IR)” in corrispondenza dei plessi dell'ENS (Chiocchetti et al., 2008; Marruchella et al., 2011).

Il trasferimento dei prioni verso l'ENS potrebbe essere mediato da cellule mobili. Le FDCs, pur essendo cellule immobili, potrebbero trasferire passivamente l'agente infettivo alle fibre nervose circostanti mediante vescicole secretorie (Prinz et al., 2003; Kujala et al., 2011). Una notevole quantità di dati, però, supporta l'ipotesi che le DCs possano svolgere un ruolo di grande importanza nella diffusione prionica. In particolare, sono state descritte alcune connessioni anatomiche esistenti tra le DCs e le cellule presenti nei plessi dell'ENS (Hosoi et al., 1993; Defaweux et al., 2005; Dorban et al., 2007a, b), nonché un aumento numerico delle stesse DCs in corso di TSE (Aucouturier et al., 2001; Cordier-Dirikoc et al., 2008). Inoltre, studi realizzati su modelli murini transgenici in cui erano state eliminate le DCs hanno dato dimostrazione che la deposizione di PrP^{Sc} nei tessuti linfoidei verrebbe di fatto impedita (Aucouturier et al., 2001; Cordier-Dirikoc et al., 2008).

Un quesito altrettanto importante riguarda il trasferimento intercellulare degli agenti delle TSE, ossia la trasmissione dei prioni dalle DCs alle FDCs, così come dalle DCs ai plessi dell'ENS. Questo trasferimento potrebbe essere mediato da vescicole provviste di membrana sulla quale è presente la PrP^{Sc}, che sono coinvolte nel trasporto di altri agenti patogeni a localizzazione intracellulare (Denzer et al., 2000a; b; Gould et al., 2003; Fevrier et al., 2004; Castro-Seoane et al., 2012). Alcuni studi hanno proposto l'esistenza di un'ulteriore potenziale forma di comunicazione intracellulare a distanza, mediata da piccole strutture citoplasmatiche cilindriche capaci di collegare cellule vicine tra loro e chiamate *tunneling nanotubes* (TNTs) (Gousset & Zurzolo, 2009). All'interno dei TNTs la PrP^{Sc} sembrerebbe viaggiare in vescicole endosomali. Resta da stabilire se il trasferimento significativo di prioni tra le cellule mediato da TNTs avvenga anche nell'ambiente dinamico dei tessuti linfoidei *in vivo* (Zhu et al., 2015).

Altri studi *in vitro* hanno dimostrato che le DCs, dopo aver ospitato e accumulato al loro interno la PrP^{Sc}, sarebbero in grado di trattenerla per alcune ore indipendentemente dai loro livelli di espressione della PrP^C. Successivamente le stesse cellule trasferirebbero la PrP^{Sc} a cellule nervose coltivate nello stesso ambiente e questo trasferimento sarebbe mediato proprio dai TNTs. Questi ultimi sarebbero pertanto in grado di favorire il passaggio dei prioni tra i neuroni stessi (Langevin et al., 2010) (Fig. n. 21).

La maggior parte degli studi sopra citati descrive la patogenesi delle malattie da prioni in animali e pazienti in ottimale stato di salute. Tuttavia, è interessante approfondire l'argomentazione sulle condizioni di alterata omeostasi che si possono verificare contemporaneamente all'infezione prionica. Certi processi infiammatori, per esempio, potrebbero avere un impatto significativo sulla patogenesi delle malattie da prioni, sia aumentando la captazione dei prioni dai siti iniziali di infezione, sia espandendo la loro distribuzione tissutale. Le patologie infiammatorie della mucosa intestinale, come quelle osservate in corso di colite batterica (Sigurdson et al., 2009), unitamente all'aumento della densità delle cellule M a livello dell'epitelio intestinale (Donaldson et al., 2016), ed alcune lesioni alle superfici mucose delle cavità orali (Denkers et al., 2011) o nasali (Crowell et al., 2015), possono modificare significativamente la suscettibilità alla malattia, probabilmente aumentando la captazione prionica. Anche l'immunizzazione ripetuta nei

confronti di qualsivoglia antigene durante il periodo di esposizione prionica può aumentare la suscettibilità alla malattia (Bremer et al., 2009). Le infiammazioni croniche a carattere linfoproliferativo, inducendo la formazione di tessuti linfoidei terziari ectopici contenenti FDCs (Fig. n. 22), potrebbero espandere la distribuzione dei prioni all'interno dell'ospite infetto, soprattutto a livello di pancreas, fegato e rene (Heikenwalder et al., 2005; Ligios et al., 2005; Seeger et al., 2005; Glaysher et al., 2007; Donaldson et al., 2015). Gli effetti dell'infiammazione cronica sulla patogenesi delle malattie da prioni potrebbero avere importanti conseguenze sulla salute umana e animale favorendo la loro trasmissione verticale e orizzontale, così come aumentando la concentrazione dei prioni escreti nel latte (soprattutto in animali con mastite) o eliminati con le urine (soprattutto in animali con nefrite) (Ligios et al., 2011; Maestrone et al., 2013).

Il processo neuroinvasivo continuerebbe per diffusione retrograda dei prioni lungo le fibre efferenti della componente simpatica e parasimpatica del SNA (Fig. n. 23) (Beekes et al., 1996; Baldauf et al., 1997; McBride & Beekes, 1999; 2000; Kujala et al., 2011). Il coinvolgimento del sistema nervoso simpatico è stato più volte dimostrato soprattutto in corso di Scrapie sperimentale nell'*hamster* (McBride & Beekes, 1999). Ulteriori indagini sperimentali hanno rafforzato ulteriormente queste ipotesi, dimostrando che la simpatectomia ritarderebbe la neuroinvasione (Glatzel et al., 2001); viceversa, la progressione dell'infezione sarebbe accelerata nei topi in cui la densità dei nervi simpatici all'interno degli SLOs è aumentata (Glatzel et al., 2001), o in quelli in cui la distanza tra FDCs e nervi simpatici è ridotta (Prinz et al., 2003). La neuroinvasione a partire dal GIT può avvenire anche senza il coinvolgimento del midollo spinale. In questo caso l'agente prionico diffonde lungo le fibre del nervo vago fino a raggiungere il NMDV, situato a livello di midollo allungato (Beekes et al., 1998; McBride et al., 2001).

La modalità di trasporto più probabile attraverso la quale i prioni raggiungerebbero il SNC sarebbe quella assonale, la quale prevede una progressiva pinocitosi degli stessi da parte della rete dendritica neuronale ed il loro trasporto retrogrado verso il pirenoforo (Hainfellner & Budka, 1999; Glatzel & Aguzzi, 2000a; b). La cinetica di trasporto della PrP^{Sc} nell'ENS e nel SNC viene riassunta nelle Figg. nn. 24 e 25.

L'agente della Scrapie proseguirebbe il suo "viaggio", quindi, raggiungendo l'*obex*, per poi diffondersi al cervelletto, al diencefalo e alla corteccia frontale attraverso la porzione rostrale del midollo allungato. Questa ordinata progressività non risulterebbe essere casuale, tanto che è stata classificata da Wemheuer et al. (2011) nei seguenti 4 stadi:

- 1) Stadio di ingresso nel SNC, con colonizzazione e accumulo della PrP^{Sc} a livello di NMDV, nucleo del tratto solitario e nucleo del tratto spinale del trigemino.
- 2) Stadio di colonizzazione del midollo allungato, con accumulo di PrP^{Sc} a livello dei nuclei dell'*obex* e nelle porzioni più rostrali del midollo allungato.
- 3) Stadio di colonizzazione del *sulcus cruciatus*, con accumulo di PrP^{Sc} a livello di mesencefalo, nuclei amigdaloidi, nuclei settali, tratto ottico, peduncolo cerebrale, ippocampo, corteccia frontale e sostanza bianca subcorticale.
- 4) Stadio di colonizzazione dei gangli della base, con accumulo della PrP^{Sc} a livello di nuclei talamici mediali, corpo genicolato e gangli della base. Alcuni depositi sarebbero talvolta rilevabili anche nella sostanza bianca.

La Fig. n. 26 riassume schematicamente il complesso *iter* che caratterizza la cinetica di neuroinvasione.

Un altro importante quesito che riguarda la patogenesi delle TSE e che ha costituito altresì un ulteriore motivo di preoccupazione per molto tempo sarebbe quello relativo alla presenza di infettività prionica nel sangue. Inizialmente, la presenza di infettività nel sangue è dimostrata in corso sia di Scrapie ovina che di vCJD (Hunter & Houston, 2002).

Numerosi studi hanno già dimostrato che la via ematogena potrebbe costituire un importante veicolo di diffusione degli agenti patogeni, cosa che sarebbe particolarmente importante per il prione responsabile della Scrapie. È stato proposto, nella fattispecie che la prionemia possa avvenire in due fasi: una prima fase immediatamente successiva alla captazione cellulo-mediata dei prioni dal lume intestinale nel sistema linfatico, seguita da una seconda fase conseguente alla replicazione prionica all'interno del LRS (Sisó et al., 2010). A tale proposito, era già stato documentato in precedenza che in corso di Scrapie murina la PrP^{Sc} risulterebbe associata ai leucociti della componente plasmatica

(Murayama et al., 2007), mentre la stessa si troverebbe associata alla frazione leucocitaria del sangue in corso di Scrapie ovina (Thorne & Terry, 2008).

Durante la Scrapie, i leucociti possono rivestire un ruolo importante nella diffusione prionica in quanto essi possono circolare nell'ambito del LRS e dei relativi tessuti linfatici. Inoltre, le cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) esprimerebbero costantemente la PrP^C sulla loro superficie (Herrmann et al., 2001; Barclay et al., 2002; Halliday et al., 2005), elemento quest'ultimo che costituirebbe un prerequisito fondamentale al fine dello sviluppo delle infezioni da prioni (Bueler et al., 1993; Brown et al., 1999; Kaeser et al., 2001).

I linfociti CD4⁺ dell'ovino esprimono livelli relativamente bassi di PrP^C sulla loro superficie (Rocchi et al., 2007), mentre i linfociti CD21⁺ presenterebbero livelli di espressione più alta (Halliday et al., 2005).

Alcuni Autori hanno inoltre valutato la capacità di diverse popolazioni leucocitarie del sangue di ovini Scrapie-infetti nel captare e accumulare la PrP^{Sc}. Essa risulterebbe associata anche a cellule che esprimono antigeni del complesso MHC di classe II nel sangue sia di ovini affetti da Scrapie naturale e sperimentale, sia di ovini BSE-infetti, durante le fasi pre-cliniche e cliniche dell'infezione. In un altro lavoro gli stessi Autori hanno dimostrato che le cellule B o una loro sottopopolazione concentrerebbero la PrP^{Sc} nel sangue di ovini con genotipo ARQ/VRQ Scrapie-infetti (Edwards et al., 2010).

Alcuni interessanti lavori, infine, hanno potuto dimostrare come anche l'età dell'ospite possa esercitare una significativa influenza sulla patogenesi e sulla suscettibilità alla malattia da prioni. I suddetti studi hanno messo in evidenza, infatti, come alcuni topi in età avanzata (≥ 600 giorni) infettati sperimentalmente per via endovenosa con l'agente della Scrapie non erano in grado di sviluppare i segni clinici della malattia, ma contemporaneamente presentavano lesioni evidenti a livello di SNC e contestuale accumulo di PrP^{Sc} a livello di SNC, rispetto ad animali giovani facenti parte dello stesso esperimento (Brown et al., 2014). Questo studio suggerirebbe pertanto che, a causa di un alterato funzionamento della zona marginale spleno-follicolare conseguente alla

senescenza, le FDCs non sarebbero in grado di captare efficacemente immunocomplessi, tantomeno agenti prionici sulla loro superficie.

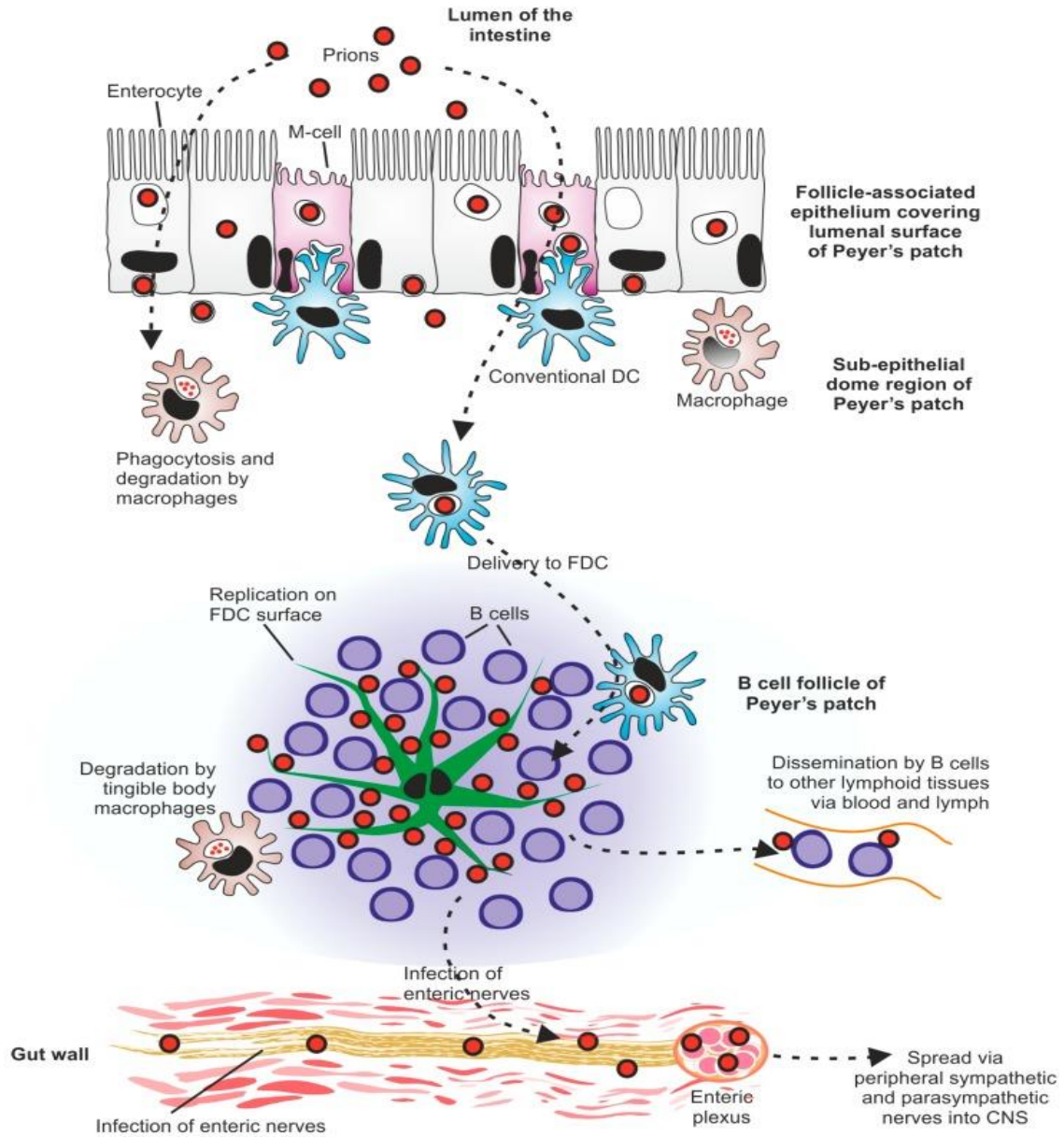


Fig. n. 17: Modalità di penetrazione dell'agente della Scrapie attraverso l'epitelio intestinale e cellule coinvolte nel trasferimento dei prioni al SNC. 1) Captazione dei prioni dal lume intestinale da parte delle cellule M con relativo trasporto attraverso l'epitelio intestinale. 2) Captazione della PrP^{Sc} da parte dei dendriti delle DCs attraverso gli enterociti o direttamente dal lume intestinale. 3) Presentazione degli antigeni da parte delle cellule M alle FDCs. 4) Replicazione prionica sulla superficie delle FDCs. 5) Trasferimento dell'infezione ai plessi dell'ENS e successiva diffusione al SNC lungo la

componente simpatica e parasimpatica del sistema nervoso autonomo (Mabbott et al., 2017).

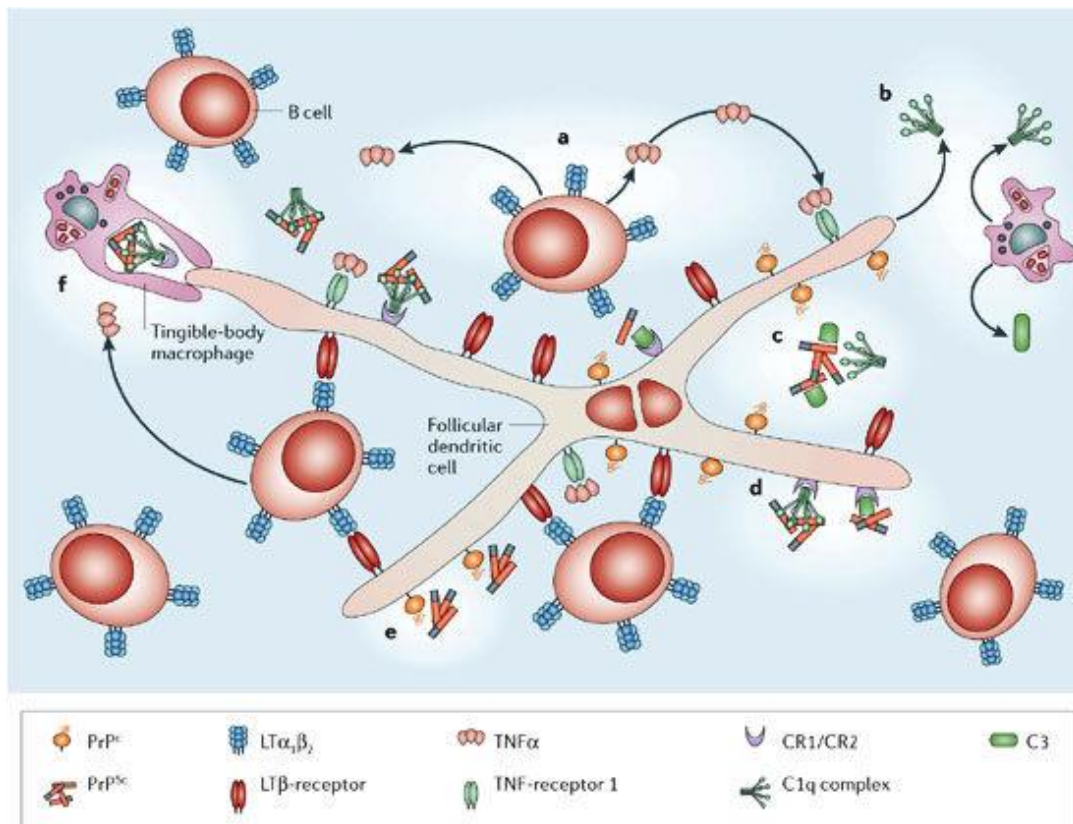


Fig. n. 18: Ruolo del tessuto linfatico nella patogenesi delle TSE: meccanismi molecolari e cellulari. (a) Le citochine prodotte dalle cellule B inducono la maturazione delle FDCs e ne determinano il mantenimento nel loro stato differenziato. In assenza di linfociti B, oppure di specifiche citochine quali $LT\alpha_1\beta_2$ e $TNF\alpha$, la maturazione delle FDCs non può aver luogo e l'accumulo della PrP^{Sc} nei tessuti linfatici verrebbe compromesso. (b, c) Le FDCs acquisiscono la PrP^{Sc} attraverso modalità non del tutto note. L'assenza di specifiche frazioni del complemento (C1q e C3) inibirebbe l'accumulo della PrP^{Sc} in sede splenica (Mabbott et al., 2001; 2004; Klein et al., 2001; Zabel et al., 2007; Michel et al., 2012, 2013); inoltre, la frazione C1q del complemento sarebbe in grado di legarsi ad un'isoforma modificata della PrP (Blanquet-Grossard et al., 2005). Pertanto, si ritiene che gli agenti delle TSE sarebbero opsonizzati da alcune frazioni del complemento e che successivamente (d) tali immunocomplessi possano legarsi ai recettori per il complemento (CR1/CR2) espressi sulla superficie delle FDCs. (e) È plausibile che la stessa PrP^C presente sulla superficie delle FDCs possa fungere da "recettore" per la PrP^{Sc} . (f) Anche i TBMs che risiedono nei follicoli linfatici possono acquisire i prioni, ma il loro ruolo patogenetico rimane incerto (Mabbott & MacPherson, 2006).

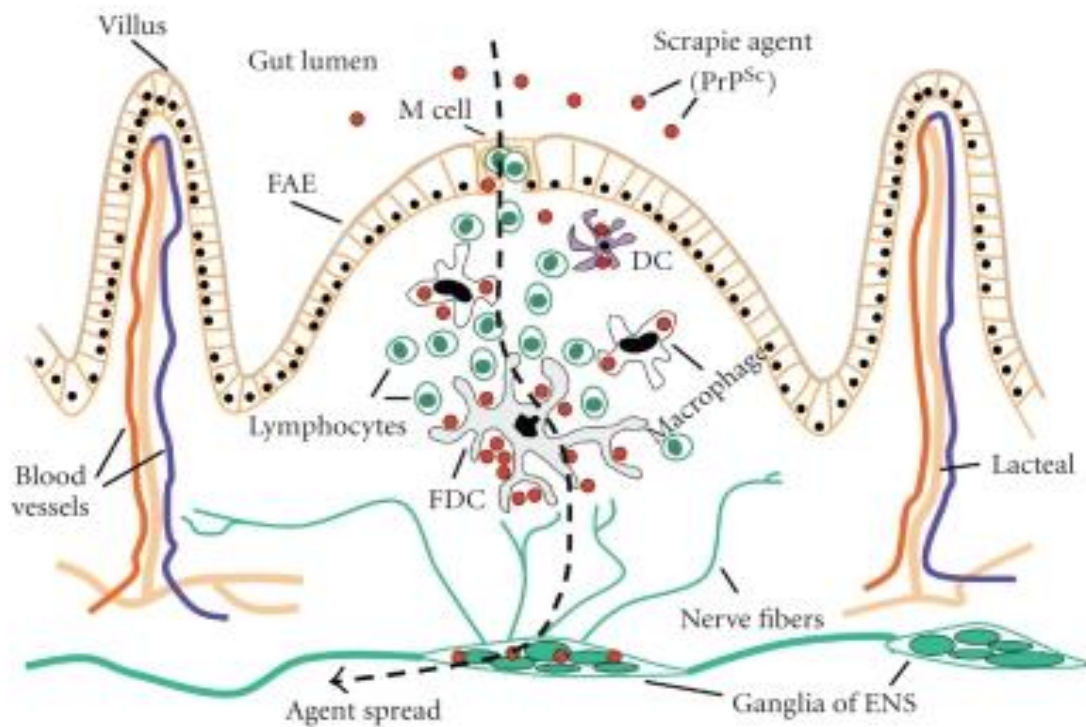


Fig. n. 19: Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi di captazione degli agenti prionici dal lume intestinale, con successivo trasposto ai plessi dell'ENS. Il processo di neuroinvasione coinvolgerebbe attivamente sia il GALT, sia la componente ortosimpatica e parasimpatica del SNA presente nei plessi mienterico e sottomucoso (Mabbott & Bruce, 2001).

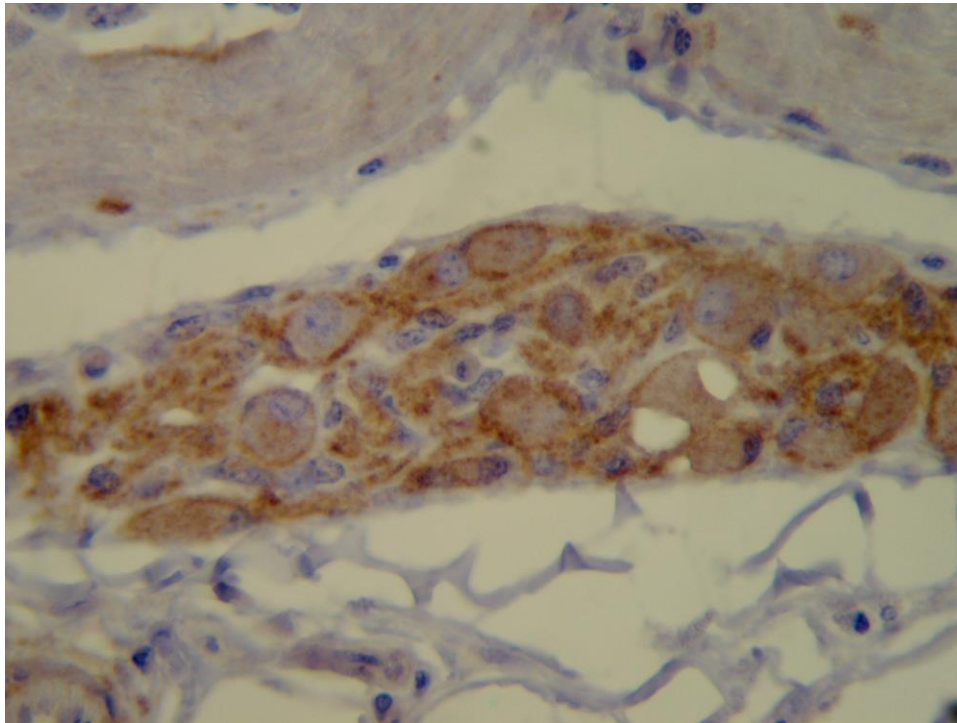


Fig. n. 20: Ovino. Ileo. Scrapie. Intensa deposizione di PrP^{Sc} a livello del plesso dell'ENS. Immunoistochimica per la PrP^{Sc}; colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, forte ingr.

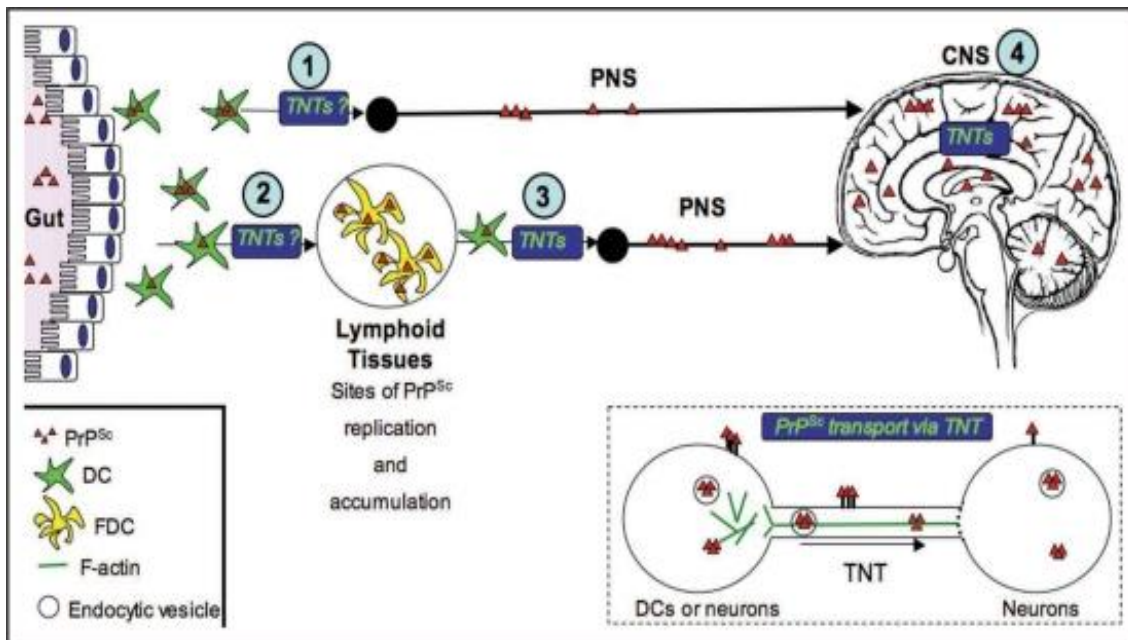


Fig. n. 21: Trasporto della PrP^{Sc} mediante i TNTs. Alcuni studi suggeriscono che i TNTs consentirebbero il trasporto intercellulare di PrP^{Sc} tra DCs e neuroni. Restano da chiarire i precisi meccanismi coinvolti. Ad esempio, non è ancora chiaro se la PrP^{Sc} venga trasportata rigorosamente all'interno di apposite vescicole endocitiche oppure se possa scorrere lungo la superficie dei TNTs o essere altresì trasportata sotto forma di aggregati all'interno dei TNTs. A causa dell'elevata propensione delle DCs a formare TNTs in condivisione con diversi tipi di cellule, è stato proposto che i TNTs possano svolgere un ruolo importante nel diffondere la PrP^{Sc} ai tipi cellulari appropriati lungo la via di neuroinvasione. Ad esempio, le DCs potrebbero trasferire la PrP^{Sc} dai siti periferici di captazione alle FDCs residenti nei SLOs (2), oppure potrebbero occasionalmente trasferire PrP^{Sc} direttamente al SNA (1). Le DCs potrebbero anche collegare le FDCs con il SNA (3), in quanto è stato dimostrato che le DCs possono formare TNTs con cellule nervose. Infine, una volta che la PrP^{Sc} ha raggiunto la sua destinazione finale all'interno del SNC, i TNTs potrebbero svolgere un ulteriore ruolo nella diffusione della PrP^{Sc} a livello cerebrale tra i neuroni e, possibilmente, anche tra cellule neuronali e astrociti (4) (Gousset & Zurzolo, 2009).

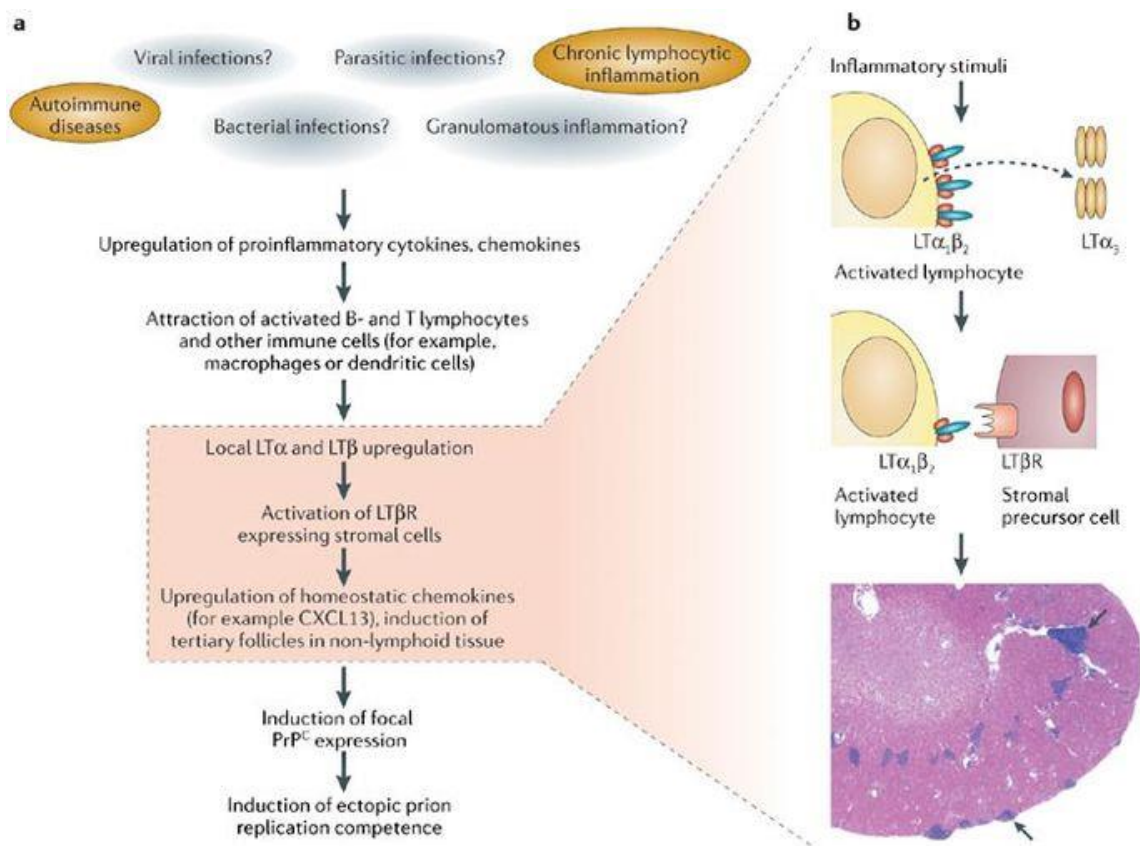


Fig. n. 22: Formazione di follicoli terziari e replicazione “ectopica” dei prioni in organi e tessuti non-linfatici. (a) Le malattie autoimmuni e le infiammazioni linfocitarie croniche possono indurre la replicazione dei prioni in sedi “ectopiche”. (b) L’attivazione dei linfociti B e T indotta da stimoli infiammatori promuove un’iper-espressione di linfotossine. Queste ultime, secrete ($LT\alpha_3$), o espresse sulla membrana cellulare dei linfociti B ($LT\alpha_1\beta_2$), si legherebbero a specifici recettori localizzati sui precursori delle FDCs, stimolando la sintesi di molecole di adesione, citochine e/o chemochine. L’effetto di questi processi sarebbe la formazione di follicoli linfoidi terziari i quali, a loro volta, potrebbero promuovere la replicazione prionica. L’immagine in basso a destra mostra una sezione di parenchima renale in preda a flogosi cronica; le frecce indicano il carattere linfo-follicolare dell’infiammazione (Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Maestrale et al., 2013).

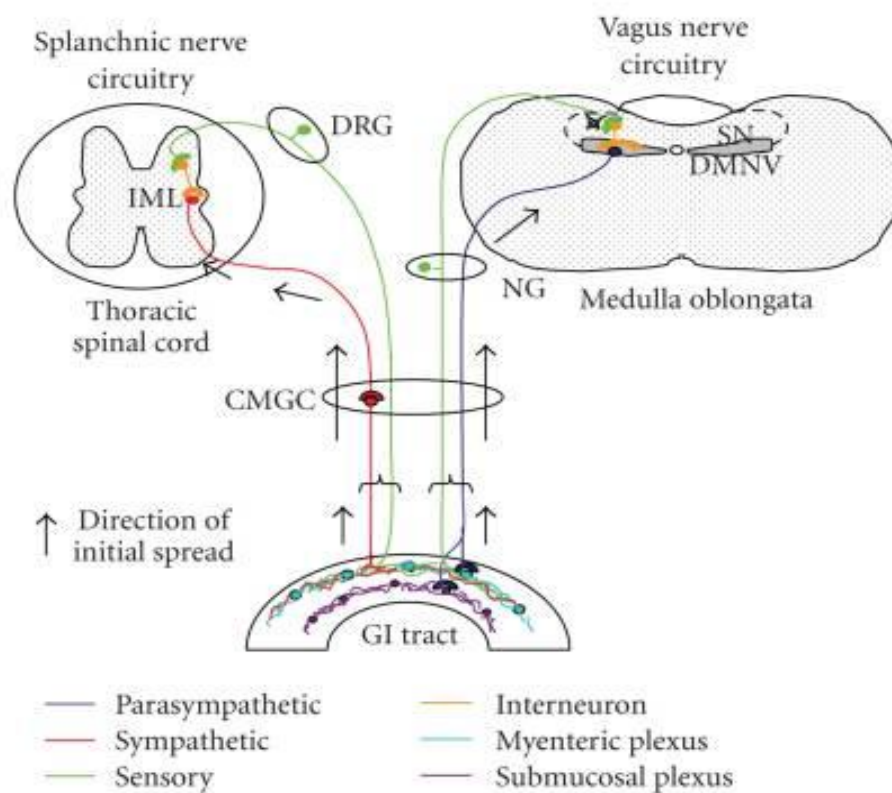


Fig. n. 23: Rappresentazione schematica del processo neuroinvasivo dal GIT al SNC in corso di Scrapie e di altre TSE. Studi sperimentali condotti in adeguati modelli animali indicano che la PrP^{Sc} diffonderebbe dal GIT al SNC attraverso due diverse vie neuro-anatomiche. Una prima via sarebbe rappresentata dalle fibre del nervo splanchnico e dalla successiva migrazione lungo il fascio intermedio laterale del midollo spinale, nella sua porzione toracica. Successivamente l'agente infettivo raggiungerebbe l'encefalo muovendosi in direzione caudo-craniale lungo il midollo spinale. Il processo neuroinvasivo a partire dal GIT, potrebbe avvenire anche senza il coinvolgimento del midollo spinale. In questo caso il prione diffonderebbe lungo le fibre del nervo vago localizzandosi successivamente a livello del midollo allungato (McBride et al., 2001; Sisò et al., 2010).

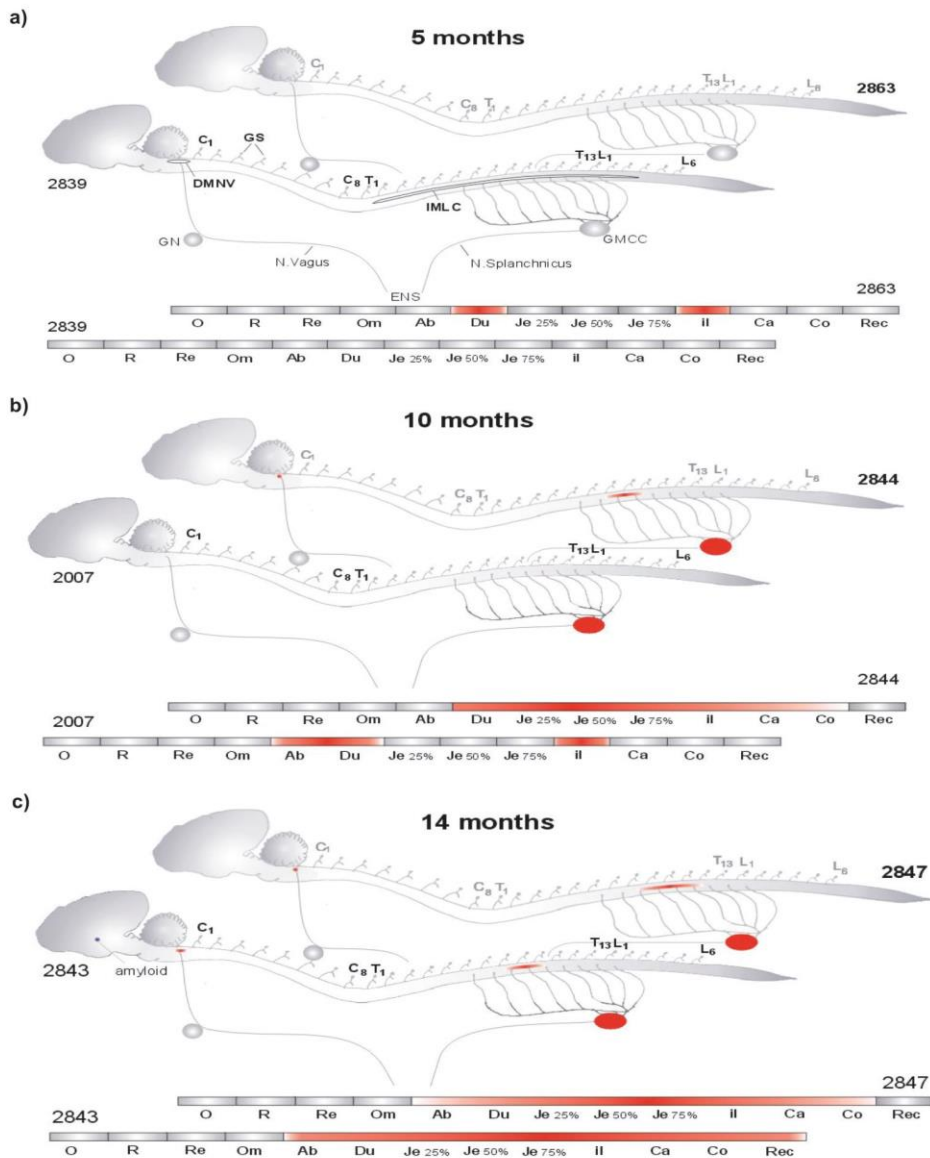


Fig. n. 24: Rappresentazione schematica dell'accumulo della PrP^{Sc} (colore rosso) nell'ENS e nel SNC in ovini recanti genotipo VRQ/VRQ ed affetti da Scrapie naturale a 5 (a), 10 (b), 14 (c) mesi di età. DMNV = nucleo motore dorsale del vago; IMLC = colonna intermedio-laterale del midollo spinale; C, T ed L = segmento cervicale, toracico e lombare del midollo spinale; GN = ganglio nodoso; GMCC = ganglio celiaco mesenterico craniale; GS = gangli spinali; O = esofago; R = rumine; Re = reticolo; Om = omaso; Ab = abomaso; Du = duodeno; Je = digiuno; Il = ileo; Ca = cieco; Co = colon; Rec = retto (van Keulen et al., 2008).

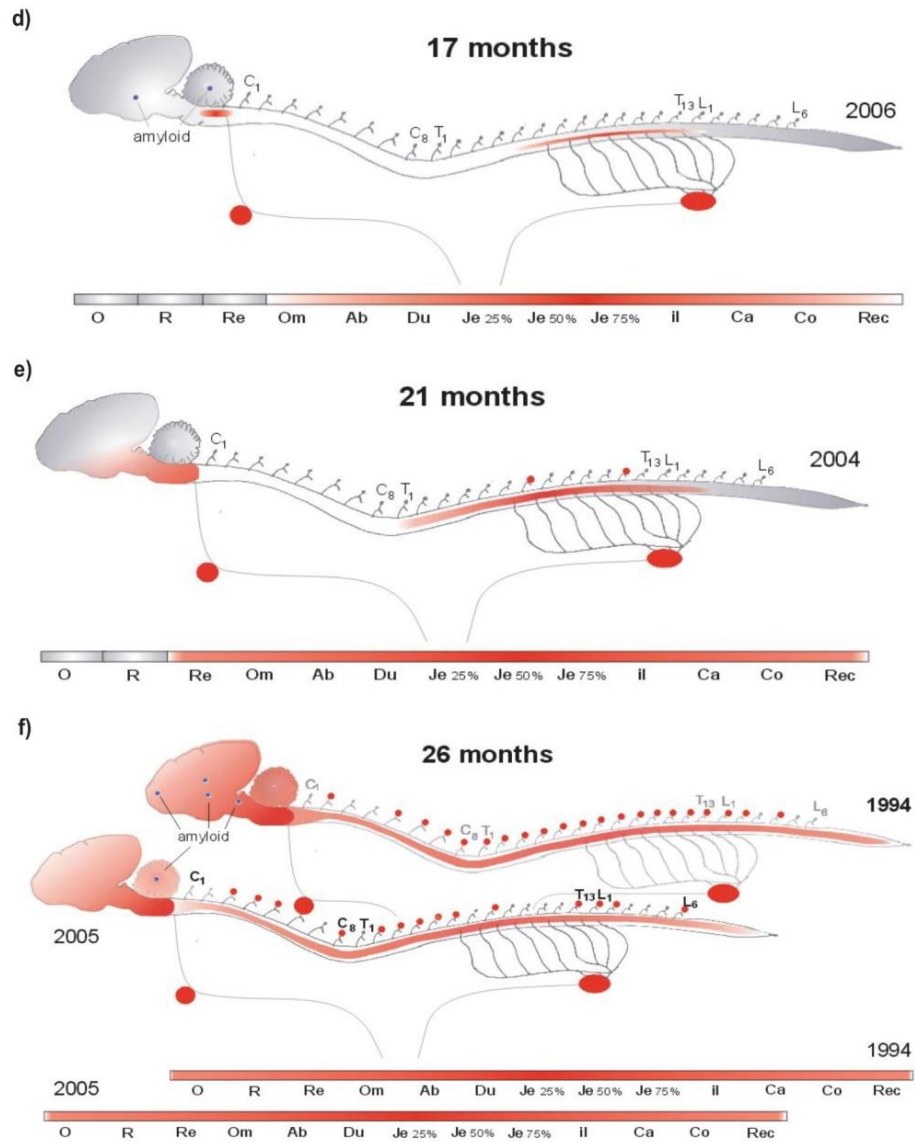


Fig. n. 25: Rappresentazione schematica dell'accumulo della PrP^{Sc} (colore rosso) nell'ENS e nel SNC in ovini recanti genotipo VRQ/VRQ ed affetti da Scrapie naturale a 17 (d), 21 (e), e 26 (f) mesi di età. DMNV = nucleo motore dorsale del vago; IMLC = colonna intermedio-laterale del midollo spinale; C, T ed L = segmento cervicale, toracico e lombare del midollo spinale; GN = ganglio nodoso; GMCC = ganglio celiaco mesenterico craniale; GS = gangli spinali; O = esofago; R = rumine; Re = reticolo; Om = omaso; Ab = abomaso; Du = duodeno; Je = digiuno; Il = ileo; Ca = cieco; Co = colon; Rec = retto (van Keulen et al., 2008).

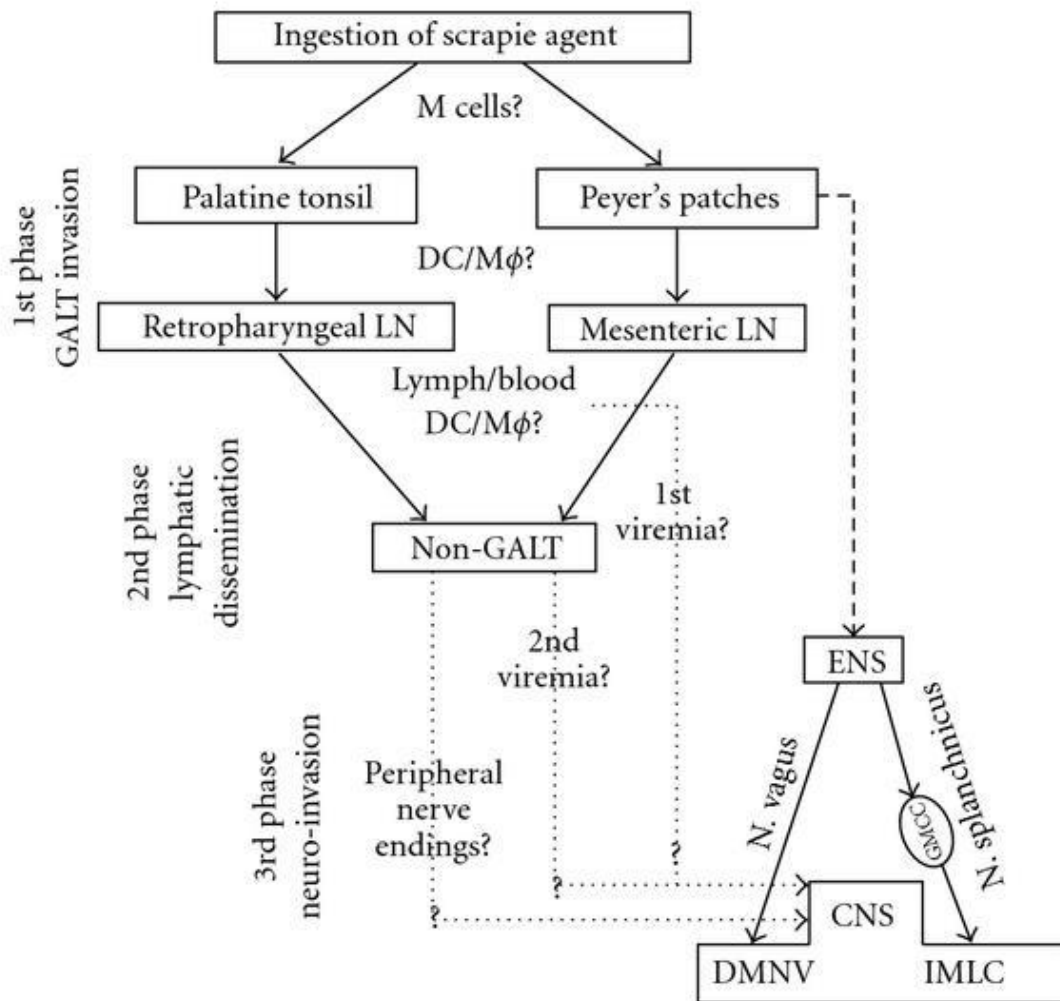


Fig. n. 26: Rappresentazione schematica del processo di neuroinvasione compiuto dall'agente prionico. 1) Prima fase: invasione del GALT; 2) Seconda fase: disseminazione linfo-ematogena; 3) Terza fase: Neuroinvasione (Sisò et al., 2010).

1.2.3 Diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio della Scrapie e di altre TSE umane ed animali si basa sull'utilizzo di adeguate tecniche immunobiochimiche ed immunoistochimiche il cui obiettivo finale è quello di dimostrare la presenza o meno della PrP^{Sc} all'interno dei tessuti (Di Guardo, 2015)

La metodica di riferimento è rappresentata proprio dall'immunoistochimica, che ad oggi rappresenta il “*golden standard*”. Quest'ultima risulta essere una metodica di carattere qualitativo attraverso la quale è possibile dimostrare, con ragionevole certezza, la presenza/assenza della PrP^{Sc} in sezioni ottenute da tessuti precedentemente fissati in formalina ed inclusi in paraffina, oppure su sezioni tissutali allestite al criostato (Fig. n. 27).

Il principio su cui si basa questa tecnica è quello di sfruttare l'affinità di anticorpi monoclonali o policlonali nei confronti della PrP, valutando la conseguente reazione antigene-anticorpo mediante opportune metodiche di “rivelazione”.

Le tecniche immunobiochimiche, quali *Western blotting* (WB) ed ELISA, sono alla base dei cosiddetti “*test rapidi*” e trovano largo impiego come *test di screening* nei piani di sorveglianza nazionale della Scrapie e della BSE. Tuttavia, in base alla vigente normativa, ogni eventuale positività ai *test rapidi* eventualmente riscontrata deve essere confermata mediante opportune indagini immunoistochimiche. Tali *test* diagnostici vengono realizzati su omogenati di tessuto cerebrale (tronco encefalico), a partire da materiale biologico fresco o congelato. Attualmente sono ammessi nei Paesi dell'Unione Europea i seguenti *test rapidi*:

- ✓ ***Prionics*** – prevede l'esecuzione di un WB su omogenati di tessuto cerebrale precedentemente digeriti con proteinasi K. La positività al test è data dalla comparsa delle caratteristiche 3 bande proteiche nelle quali si stratifica la PrP^{Sc} (Fig. n. 28).

- ✓ **Platelia** – è un ELISA *sandwich* il quale viene eseguito su piastre a 96 pozzetti. Anche in questo caso l'omogenato viene sottoposto ad un pre-trattamento con proteinasi K. La positività è svelata dallo sviluppo di una reazione colorimetrica.
 - ✓ **Enfer** – è un test ELISA. La metodica è molto simile a quella descritta per *Platelia*. In questo caso, però, il campione viene fatto reagire con anticorpi anti-PrP coniugati con un enzima che dà luogo ad una reazione di chemiluminescenza.
- Il test *Pionics*, prodotto in Svizzera e ufficialmente utilizzato in Italia, rappresenta a decorrere del 2001 il principale test ufficiale su cui si basa, nell'intero territorio dell'UE, la sorveglianza “attiva” nei confronti della BSE e a decorrere dal 2002, viene parimenti utilizzato nei confronti della Scrapie ovi-caprina.
- Il prelievo dei campioni di tessuto cerebrale da destinare alle indagini diagnostiche deve essere effettuato previa disarticolazione della testa a livello dell'articolazione atloido-occipitale. Quindi si dovrà procedere all'apertura della scatola cranica e alla successiva estrazione dell'encefalo “*in toto*” (animali sintomatici), oppure al prelievo del tronco encefalico mediante un apposito cucchiaino da inserire nel *foramen magnum* (animali sottoposti a sorveglianza attiva). Il tessuto cerebrale così prelevato deve essere inviato nel più breve tempo possibile al laboratorio dove verrà suddiviso longitudinalmente in due parti. Una parte sarà quindi congelata a -20°C oppure a -80°C, mentre l'altra verrà fissata in formalina neutra tamponata al 10% per le successive indagini istomorfologiche ed immunoistochimiche eventualmente necessarie. Un problema di notevole importanza inerente al prelievo dei tessuti è legato alla corretta conservazione di questi, al fine di poter ottenere risultati affidabili in sede di indagini laboratoristiche. Uno studio condotto da Huang et al. (2011) ha valutato gli effetti del diverso grado di autolisi dei campioni di tessuto cerebrale sulla rilevazione della PrP^{Sc}, riportando che dopo 15 giorni di autolisi post-mortale a 37°C diminuirebbero visibilmente i livelli di PrP^{Sc} nel tessuto linfoide e nel SNC di animali infetti. La PrP^{Sc} residua verrebbe comunque svelata attraverso WB ed ELISA. Il problema eventualmente sorgerebbe qualora i depositi di PrP^{Sc} non dovessero essere uniformi e, soprattutto, qualora questi fossero di modesta entità. In questo caso la probabilità di ottenere risultati falsamente negativi sarebbe aumentata.

Un problema tecnico di fondo connesso all'utilizzo delle suddette metodiche diagnostiche, siano esse di tipo immunoistochimico che immunobiochimico, è quello legato all'identità di sequenza aminoacidica (struttura primaria) fra PrP^C e PrP^{Sc} cosa che rende assai complessa la produzione di anticorpi (monoclonali e policlonali) in grado di discriminare le due isoforme. Per ovviare a tale inconveniente, sono stati studiati diversi pre-trattamenti di tipo chimico-fisico (proteinasasi K, acido formico al 96-98%, isotiocianato di guanidina, autolavaggio a 121°C, ecc) che, adeguatamente applicati – da soli o in associazione – riducono o eliminano la positività immunoistochimica nei confronti della PrP^C, esaltando al contempo quella della PrP^{Sc} (Di Guardo, 2015).

La PrP^{Sc} può altresì essere dimostrata mediante l'impiego della microscopia elettronica a trasmissione a contrasto negativo su omogenati di tessuto cerebrale pretrattati con appositi detergenti, dove appare con l'aspetto delle caratteristiche fibrille note come SAF o *prion rods*.

I *test* diagnostici finora citati possono trovare applicazione non solo se eseguiti su campioni di tessuto cerebrale (*post-mortem*), ma anche nella diagnosi *ante-mortem* su tessuti prelevabili *intra vitam*, quali tonsille palatine, terza palpebra e RAMALT. Tuttavia, la diagnosi *intra vitam* delle TSE mediante l'utilizzo di tecniche immunoistochimiche ed immunobiochimiche non gode di un livello di “standardizzazione” e di “validazione” ufficiale in ambito internazionale, paragonabile a quello relativo all'applicazione delle medesime metodiche sul tessuto cerebrale (Schreuder et al., 1996; O'Rourke et al., 2000; González et al., 2008 a, b; Di Guardo, 2015).

Relativamente alla possibilità di una diagnosi *intra-vitam* delle TSE, sono state segnalati vari elementi, quali:

- a) dimostrazione di un legame selettivo della PrP^{Sc} (ma non della PrP^C) con il plasminogeno;
- b) dimostrazione di una notevole riduzione dei livelli di espressione dell'EDRF (*Erythroid Differentiation-related Factor*);
- c) dimostrazione della presenza, nelle urine, di uno specifico *marker* di infezione (UPrP^{Sc}), simile alla PrP^{Sc}, sebbene privo di potere infettante, la cui comparsa

precederebbe di gran lunga, nel criceto, l'insorgenza dei segni clinici di malattia. Successive indagini spettrofotometriche hanno tuttavia permesso di definire la natura immunoglobulinica di tale composto, ascrivibile alla catena leggera delle immunoglobuline;

- d) dimostrazione di un legame selettivo della PrP^{Sc} con le lipoproteine plasmatiche (VLDL e LDL, ma non HDL) nel tessuto cerebrale di pazienti umani affetti da vCJD.

La presenza della PrP^{Sc} non è sempre facilmente dimostrabile in corso di TSE, cosa che ha motivato la realizzazione di un protocollo di amplificazione *in vitro* della stessa del tutto simile alla PCR. La metodica in questione prende il nome di PMCA e, sebbene notevolmente perfezionata nel corso degli anni (anche ai fini della diagnosi preclinica), può generare risultati falsamente positivi in condizioni sperimentali non adeguatamente controllate (Cosseddu et al., 2011; Di Guardo, 2015).

In campo umano, ai fini della diagnosi *intra vitam* delle TSE è stata proposta la ricerca nel liquido cefalo-rachidiano (LRC) delle proteine della famiglia 14-3-3 e anche la ricerca della PrP^{Sc} nel LCR di pazienti affetti da vCJD mediante una tecnica molto sensibile, denominata SIFT (*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*).

In campo veterinario la proteina 14-3-3 non mostra particolare utilità diagnostica nella Scrapie ovina in quanto sarebbe un *marker* diagnostico sensibile (95%), ma poco specifico (60%) (Di Guardo, 2015)

Infine, in uno studio molto recente è stata valutata la possibilità di rilevare la PrP^{Sc} nel sangue intero di ovini Scrapie-infetti utilizzando un semplice saggio immunologico indipendente da proteinasi e denaturazione, basato sull'affinità competitiva di un anticorpo monoclonale specifico (15B3) e streptavidina nei confronti della PrP^{Sc}. Questi studi iniziali forniscono informazioni sullo sviluppo di un test di *screening* su larga scala per la diagnosi di *routine* della Scrapie ovina (Soutyrine et al., 2017).

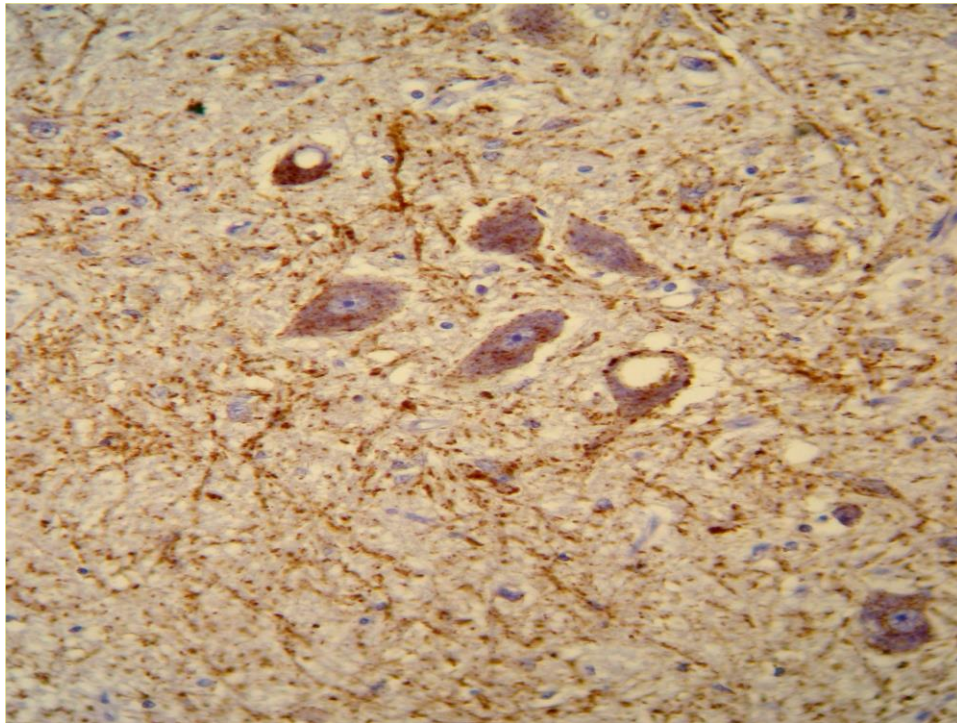


Fig. n. 28: Ovino. Cervello. Scrapie. Intensa e diffusa deposizione di PrP^{Sc} a livello del NMDV. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, medio ingr.

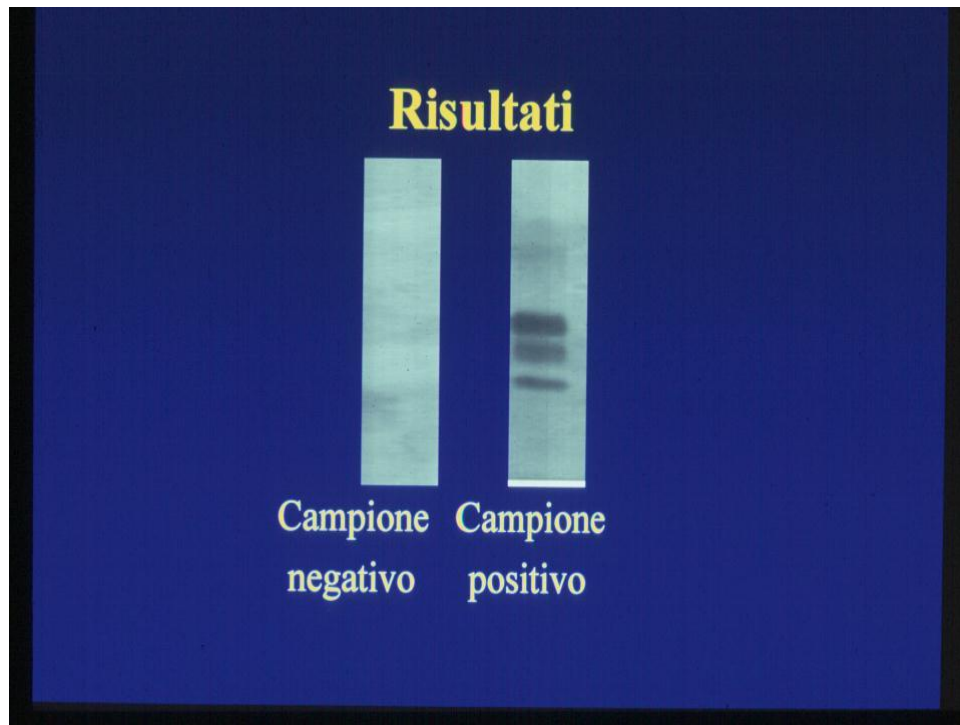


Fig. n. 28: Bovino. BSE. Western Blotting (WB) su omogenato di tessuto cerebrale di un animale BSE-negativo (*lane 1*) e di un animale BSE-infetto (*lane 2*), in cui si possono notare le tre bande proteiche in cui si stratifica la PrP^{Sc}.

1.3 GHIANDOLE SURRENALI

1.3.1 Embriogenesi

Le ghiandole surrenali sono organi pari, simmetrici e bilaterali, di forma relativamente stretta e allungata situati in cavità addominale; accompagnano il margine mediale di ogni rene, dall'ilo all'estremità craniale. L'insieme è avvolto da una spessa capsula adiposa. La ghiandola di sinistra si pone a stretto contatto con l'aorta, in prossimità dell'origine dell'arteria mesenterica craniale ed è incrociata dai vasi addomino-frenici. La destra si pone un po' più cranialmente, applicata contro la vena cava caudale, al di sotto del pilastro destro del diaframma (Barone, 1981).

Prendono origine nel corso della vita embrionale all'incirca durante la quinta settimana gestazione, quando le cellule mesoteliali poste tra la radice del mesentere e le gonadi in via di sviluppo cominciano a proliferare e ad insinuarsi nel parenchima sottostante. Qui esse si differenziano in grandi organi acidofili che formano la corticale fetale o corteccia primitiva della ghiandola surrenale. Poco dopo una seconda ondata di cellule provenienti dal mesotelio penetra nel mesenchima e circonda i primitivi ammassi cellulari acidofili. Queste cellule, più piccole delle precedenti, andranno poi a formare la corticale definitiva della ghiandola. Dopo la nascita la corticale fetale regredisce rapidamente, tranne che nei suoi strati più esterni che si differenziano così nella zona reticolare della corticale. La corticale raggiungerà la propria struttura definitiva solamente alla pubertà.

Mentre la corticale fetale si sta formando, cellule originatesi nel sistema ortosimpatico derivanti dalla cresta neurale della regione toracica invadono la sua porzione mediale e qui si organizzano in cordoni e gruppi cellulari. Queste cellule che danno origine alla midollare della ghiandola surrenale, presentano nel loro citoplasma minuti granuli di colore scuro osservabili nei preparati fissati con soluzioni contenenti bicromato di potassio (granuli cromaffini), prendendo il nome di *cellule cromaffini* e altro non sono che neuroni post-gangliari privi di assoni.

Mentre nella vita intra-uterina le cellule cromaffini risultano diffuse in vari organi fetali, nell'adulto ne persiste solo un piccolo gruppo situato nella midollare del surrene (Sadler, 2016).

1.3.2 Struttura e funzione

La struttura macroscopica delle ghiandole surrenali risulta essere costituita nei mammiferi da due distinte zone che differiscono tra loro oltre che per l'origine embrionale, anche dal punto di vista funzionale. I due distinti settori sono disposti in porzioni diverse della ghiandola: la *zona corticale* (tessuto perirenale), disposta alla periferia della ghiandola e secernente vari ormoni steroidei e la *zona midollare* (tessuto cromaffine), che occupa la porzione centrale.

La corticale, altresì detta corteccia, è composta da tre aree concentriche ben riconoscibili nei preparati microscopici: la *zona glomerulare* (15%), disposta immediatamente al di sotto della capsula connettivale che avvolge l'organo ed è formata da aggregati cellulari rotondeggianti; la *zona fascicolata* o *fascicolare* (78%), costituita da cellule di forma poliedrica più grandi di quelle della zona glomerulare e disposte in lunghi cordoni paralleli che sono distribuiti radialmente rispetto alla midollare; la *zona reticolare* (7%), confinante con la midollare della ghiandola e costituita da cordoni cellulari intrecciati a formare una sorta di rete.

Le cellule che compongono la corticale del surrene presentano caratteristiche strutturali comuni a tutte le cellule endocrine a secrezione steroidea. Gli ormoni adrenocorticali appartengono a tre distinte categorie: gli *ormoni glucocorticali* (corticosterone, cortisone e cortisolo), che svolgono importanti funzioni metaboliche riguardanti i carboidrati, le proteine e i lipidi; gli *ormoni mineralcorticoidi* (aldosterone, desossicorticosterone), che regolano l'equilibrio idro-elettrolitico; gli *ormoni sessuali* (androgeni, estrogeni e progesterone). Si può ritenere sufficientemente accertato che le diverse funzioni endocrine riguardino separatamente le tre distinte zone della corticale surrenale e precisamente: i mineralcorticoidi sono secreti dalla zona glomerulare, i glucocorticoidi e gli ormoni sessuali sono secreti dalle zone più interne, fascicolata e reticolare rispettivamente. Come ben noto, la secrezione degli ormoni glucocorticoidi (ma non quella degli ormoni mineralcorticoidi) è controllata dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH), secreto dal lobo anteriore dell'adenoipofisi.

La *midollare del surrene* è composta, come già esposto in precedenza, da grosse cellule epitelioidee raccolte in gruppi rotondeggianti o corti cordoni in stretta connessione con i capillari sanguigni, le cellule cromaffini. Tali cellule sono innervate da fibre pre-gangliari del sistema nervoso autonomo (ortosimpatico) e, in risposta ad uno stimolo colinergico, sintetizzano e liberano nel sangue le *catecolamine* (epinefrina e norepinefrina), che svolgono le proprie funzioni oltre che sull' apparato cardio-vascolare, anche su diversi sistemi metabolici. Una serie di indagini immunocitochimiche/immunoistochimiche ci permette di distinguere nel contesto della midollare surrenale due tipi cellulari: uno contenente epinefrina e l'altro norepinefrina. La caratteristica di entrambi i tipi cellulari, quando osservati al microscopio elettronico, è l'abbondanza all'interno del citoplasma di granuli elettrondensi (granuli cromaffini), delimitati da membrana, che si ritiene possano essere la sede di accumulo delle catecolamine. I granuli contenenti norepinefrina si distinguono da quelli contenenti epinefrina per la presenza di una zona centrale molto più elettrondensa della zona periferica. È oramai accertato che gli ormoni della midollare surrenale siano secreti per microesocitosi e non per diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica come si riteneva in passato.

La secrezione degli ormoni della midollare è sottoposta al controllo del sistema nervoso simpatico, le cui fibre pregangliari colinergiche terminano ramificandosi attorno a ciascuna cellula della midollare. Queste cellule sono quindi considerate comunemente neuroni simpatici postgangliari modificati (Monesi, 2012).

1.3.3 Rapporti con il sistema nervoso autonomo (SNA)

L'innervazione delle ghiandole surrenali rappresenta un aspetto di particolare importanza in riferimento agli obiettivi del presente lavoro, su cui vale la pena centrare la nostra attenzione.

Anche se in passato si pensava che la componente nervosa fosse esclusivamente distribuita nella midollare, essendo questa un ganglio modificato del sistema simpatico (“paraganglio simpatico”), è opinione comune attualmente che le cellule delle ghiandole surrenali ricevano un'innervazione intrinseca e un'innervazione estrinseca.

La maggior parte delle fibre estrinseche che innervano la ghiandola derivano dal nervo splancnico e, dopo aver penetrato la capsula, si diramano ampiamente nello spazio subcapsulare; da qui le fibre passano sia a livello corticale che midollare, si diramano ulteriormente e circondano le cellule di entrambe le regioni. L'innervazione intrinseca deriva invece dalle cellule gangliari, è sparsamente distribuita in tutta la ghiandola, dalla regione sottocapsulare fino alle regioni corticali e midollari (Coupland, 1965; Lewis & Shute, 1969).

L'innervazione estrinseca che riguarda la midollare del surrene è costituita da fibre afferenti pregangliari colinergiche provenienti dal segmento T7 - T9 del midollo spinale (Hoshi, 1926; Hollinshead, 1937). Nel corso degli anni alcuni Autori hanno dimostrato che la midollare del surrene riceve sia fibre pregangliari provenienti, come detto, dai nervi simpatici del segmento toracico del midollo spinale, sia assoni postgangliari provenienti da gangli paravertebrali lombari (Coupland et al. 1989; Parker et al. 1990b).

Per quanto concerne la corticale surrenale, invece, diversi studi hanno dimostrato che essa contiene fibre nervose (Alpert, 1931, Willard, 1936). L'opinione comune, però, era orientata a sostenere che tali fibre potessero semplicemente attraversare la corticale prima di innervare le cellule cromaffini della midollare. Anche se sembra probabile che il sistema nervoso possa essere coinvolto nel controllo della secrezione corticale, mancano ancora prove sull'esatta natura dei circuiti, in particolare sull'origine delle fibre nervose che innervano la corteccia surrenale.

L'innervazione intrinseca consiste di cellule gangliari situate sotto la capsula o sparse tra corticale e midollare (Watenabe et al., 1990). Alcuni Autori hanno dimostrato che almeno alcune delle cellule gangliari intrinseche situate nel contesto della midollare proiettano fibre alla corticale e sono considerate derivanti da neuroni del simpatico che si sono differenziati durante la vita embrionale dalla cresta neurale (Oomori et al., 1991).

La midollare del surrene contrae rapporti soprattutto con il sistema nervoso ortosimpatico. Fibre simpatiche che innervano la midollare surrenale nascono principalmente dai segmenti T3 - L2 del midollo spinale. La maggior parte delle fibre però prende origine a livello dei segmenti T9 - T10, i cui pirenofori si trovano a livello di nucleo intermedio laterale. Le fibre simpatiche pregangliari che originano da T7 attraversano senza interruzione anche i gangli prevertebrali e, insieme ai nervi splanchnici, raggiungono la midollare del surrene dove stimolano la produzione di catecolamine da parte delle cellule cromaffini.

La Fig. n. 30 illustra schematicamente l'innervazione delle ghiandole surrenali e i rapporti con il SNA.

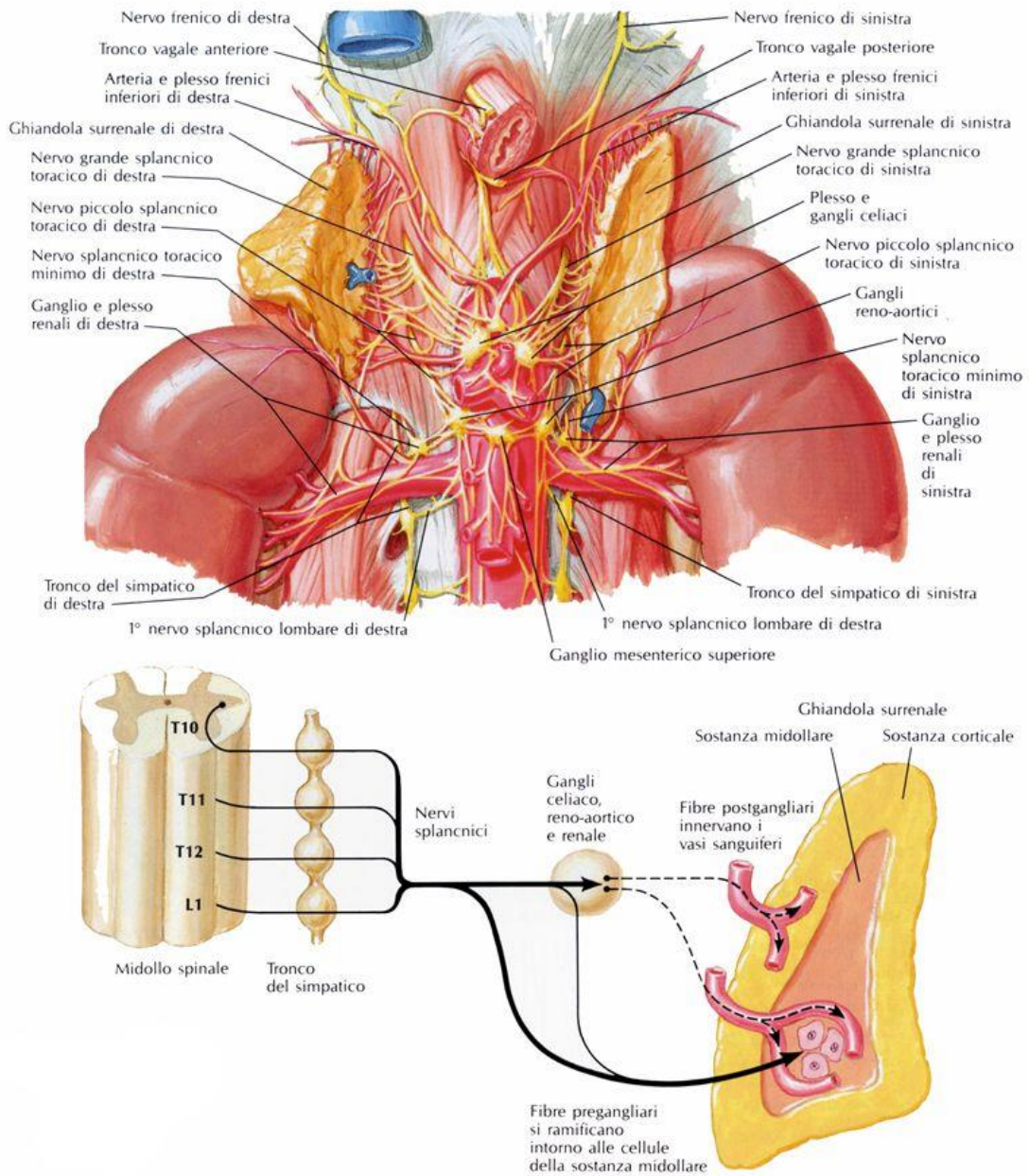


Fig. n. 30: Innervazione delle ghiandole surrenali e rapporti con il SNA.

PARTE SPECIALE

2.1 SCOPI DELLA TESI

La Scrapie rappresenta il prototipo delle TSE, malattie neurodegenerative, infettive e trasmissibili ad esito costantemente fatale. Come illustrato ampiamente nella Parte Generale, si ritiene che in condizioni naturali l'infezione si realizzi prevalentemente per via orale e la successiva neuroinvasione possa avvenire per diffusione dei prioni lungo le fibre efferenti della componente simpatica e parasimpatica del sistema nervoso autonomo, oltre che attraverso la via linfo-ematogena, coinvolgendo in questo percorso un elevato numero di elementi cellulari e di distretti anatomici. In effetti, dopo il passaggio attraverso l'epitelio intestinale, attraverso gli enterociti o veicolato da cellule specializzate (cellule M), l'agente prionico replicherebbe in altri tipi cellulari immobili presenti a livello dei centri germinatici delle PPs (FDCs) e da qui colonizzerebbe i plessi nervosi dell'ENS (plesso mienterico o di *Auerbach* e plesso sottomucoso o di *Meissner*), da dove prenderebbe successivamente origine il vero e proprio processo neuroinvasivo (McCulloch et al., 2011).

È in questo contesto che si collocano le ghiandole surrenali nelle malattie da prioni. La midollare surrenale, come noto, rappresenta un "ganglio modificato del simpatico", ricevendo fibre pregangliari direttamente dai nervi splancnici o dai gangli addominali celiaco, aortico e renale (Fig. n. 30).

Scopo del presente lavoro è stato, pertanto, quello di valutare il coinvolgimento delle ghiandole surrenali in ovini di razza Sarda infettati sperimentalmente con l'agente della scrapie.

2.2 MATERIALI

2.2.1 Animali

Sono stati oggetto di studio un numero totale di 35 animali di razza Sarda con genotipo suscettibile ARQ/ARQ e ARQ/AHQ, provenienti da un allevamento indenne da Scrapie. Gli ovini inclusi sono stati sottoposti ad un rigoroso protocollo di infezione sperimentale ufficialmente approvato dalle Autorità Competenti, che ha previsto l'infezione *per os* di alcuni di essi (28) e l'inoculazione per via intracerebrale (IC) per altri (7). Gli animali sono stati quindi sottoposti ad eutanasia seguendo un preciso programma di abbattimento selettivo ad intervalli predeterminati, nel pieno rispetto delle norme riguardanti il benessere e la sperimentazione animale.

Da tutti gli ovini in oggetto è stata prelevata una vasta gamma di tessuti, che sono stati immediatamente fissati in formalina neutra al 10% per le successive indagini istomorfologiche ed immunoistochimiche nei confronti della PrPSc. I medesimi tessuti sono stati altresì congelati a -80°C per le relative indagini immunobiochimiche (WB) nei confronti della PrPSc.

Tutti gli ovini oggetto d'indagine sono stati preventivamente genotipizzati presso il Laboratorio di Medicina Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità, nell'ambito delle attività relative al Progetto di Ricerca dal quale trae origine la presente Tesi di Laurea, Progetto di Ricerca coordinato dal Dr Umberto Agrimi, con la collaborazione attiva dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana.

2.3 METODI

2.3.1 Indagini istopatologiche

Da ogni singolo animale oggetto d'indagine sono stati prelevati campioni da numerosi organi, tessuti nervosi, linfatici ed extralinfatici. Su tutti i succitati distretti tissutali sono state eseguite approfondite indagini istopatologiche, immunoistochimiche ed immunobiochimiche finalizzate alla ricerca della PrP^{Sc}.

Gli organi e i tessuti campionati da ciascun ovino sono stati i seguenti:

- 1) **SNC:** Cervello, midollo allungato e midollo spinale cervicale.
- 2) **SNP (Sistema Nervoso Periferico):** Gangli (CCG, CTG, TG, PGG, DGG, PVG, DVG, CMG); tronco vago-simpatico destro e sinistro; catena simpatica paravertebrale destra e sinistra.
- 3) **LRS:** Tonsille palatine (PT), PPs (ileali e non), linfonodi (Retrofaringeo destro e sinistro, Mandibolare destro e sinistro, Parotideo destro e sinistro, Cervicale profondo destro e sinistro, Tracheobronchiale, Mediastinico, Popliteo destro e sinistro, Prescapolare destro e sinistro, Meseraici, Gastroenterici); emolinfonodi, milza, terza palpebra (destra e sinistra).
- 4) **Altri tessuti:** Lingua, polmone, fegato, rene, cuore, **ghiandole surrenali.**

I campioni prelevati sono stati fissati in formalina neutra al 10%, inclusi in paraffina e sezionati al microtomo ad uno spessore di 5µm.

Le sezioni ottenute da ciascun campione tissutale sono state colorate con Ematossilina-Eosina ed osservate al microscopio ottico.

2.3.2 Indagini immunostochimiche

Le indagini immunostochimiche utilizzate al fine di svelare la presenza della PrP^{Sc} sono state eseguite su sezioni tissutali di 5µm di spessore, poste a loro volta su vetrini pretrattati con APES (*3-aminopropyl-triethoxy-silane*, Sigma-Aldrich, Germany). L'inibizione delle perossidasi endogene è stata realizzata mediante immersione delle sezioni in una soluzione di perossido di idrogeno (H_2O_2) al 3% in metanolo assoluto per 20' a temperatura ambiente. Lo smascheramento degli antigeni è stato ottenuto attraverso un adeguato protocollo di pretrattamento avente lo scopo di rendere maggiormente esposti gli antigeni e, contemporaneamente, di degradare la PrP^C. Le sezioni sono state, a tal fine, immerse in acido formico al 96-98% per 2' a temperatura ambiente e successivamente sottoposte a trattamento termico in autoclave a 121°C per 15' in tampone citrato 0,01M, pH 6. I suddetti pretrattamenti comportano la completa degradazione della PrP^C e la riesposizione degli antigeni. Il blocco delle proteine endogene è stato ottenuto trattando i vetrini con una soluzione di siero normale al 5% in PBS (*normal goat serum*, Vector, UK).

L'eventuale presenza della PrP^{Sc} è stata rilevata mediante l'utilizzo, alla diluizione finale di 1:800 in PBS, di un anticorpo monoclonale murino (clone F99/97.6.1, VRMD, USA) in grado di riconoscere un epitopo altamente conservato (sequenza aminoacidica 220-225) della PrP dei ruminanti, con il quale le sezioni sono state incubate per 1 h a 37°C.

Successivamente i campioni sono stati trattati con un anticorpo secondario biotinilato diluito 1:200 in PBS per 30' a temperatura ambiente (*Biotinilated goat anti-mouse*, Vector Laboratories, USA).

La reazione immunostochimica è stata sviluppata mediante l'utilizzo di un kit commerciale ABC (*Vectastain elite ABC kit*, Vector Laboratories, USA) e visualizzata usando come cromogeno la DAB (*3-3'diaminobenzidine*, Vector Laboratories, USA). Come colorante di contrasto è stata utilizzata l'ematossilina di Mayer. All'interno di ogni ciclo di prove immunostochimiche sono stati inclusi

campioni di controllo positivi e negativi, i primi rappresentati da tessuti ottenuti da casi confermati di Scrapie, i secondi da analoghi tessuti trattati omettendo il suddetto anticorpo primario anti-PrP.

2.3.3 Indagini immunobiochimiche (*Western Blotting*)

Le indagini immunobiochimiche (*Western Blotting*, WB) sono state condotte su campioni tissutali prelevati ed immessi, previa omogenizzazione, in adeguata soluzione tampone (*Prionics-Chek WESTERN SR*). I campioni sono stati successivamente trasferiti su apposite piastre a 96 pozzetti per essere trattati con una miscela di agenti ottimizzanti, composta a sua volta da proteasi e da una soluzione tampone. La funzione di tale miscela è quella di degradare la PrP^C preservando, al contempo, la PrP^{Sc} eventualmente presente nei campioni in esame. In seguito, mediante elettroforesi su gel, le proteine sono state separate in base al loro peso molecolare e trasferite successivamente su un'apposita membrana di nitrocellulosa. La PrP^{Sc} eventualmente presente all'interno del campione risulterà pertanto legata da una miscela di anticorpi monoclonali. Successivamente la stessa verrà associata, tramite l'utilizzo di un anticorpo secondario, ad un enzima il quale emetterà un apposito segnale dopo l'aggiunta di alcuni reagenti.

2.4 RISULTATI

2.4.1 Indagini istopatologiche

Le indagini istopatologiche condotte sulle ghiandole surrenali degli ovini oggetto d'indagine non hanno consentito di rilevare alterazioni microscopiche di particolare rilievo all'interno delle medesime, mentre gli ovini con manifestazioni cliniche tipicamente riconducibili alla Scrapie mostravano in sede cerebrale le classiche lesioni istologiche proprie della malattia (vacuolizzazione neuronale, spongiosi del neuropilo, astrogliosi/astrocitosi).

2.4.2 Indagini Immunoistochimiche

Le indagini immunoistochimiche eseguite sulle ghiandole surrenali prelevate da ogni singolo animale previamente sottoposto ad eutanasia hanno dimostrato che, a seguito d'infezione *per os* con il ceppo di Scrapie utilizzato nel protocollo sperimentale in oggetto, la prima positività si riscontrerebbe a partire dai 20 mesi post-infezione (p.i.). A tal proposito, la positività immunoistochimica nei confronti della PrP^{Sc} ha coinvolto esclusivamente la midollare del surrene ed è risultata molto più intensa negli ovini abbattuti nelle fasi della sperimentazione in cui le manifestazioni cliniche tipicamente riconducibili alla malattia (Scrapie) erano già in atto (Figg. nn. 31; 32; 33; 34; 35 e 36). I suddetti animali mostravano, altresì, evidenza immunoistochimica ed immunobiochimica (WB) di aggregati di PrP^{Sc} in ambito sia cerebrale, sia di ghiandole surrenali. Di particolare interesse è risultata, in tale contesto, la contestuale deposizione di PrP^{Sc} anche in corrispondenza di alcuni fasci di fibre nervose decorrenti nello spessore della corticale del surrene (Figg. nn. 37 e 38).

Negli animali inoculati per via intracerebrale, invece, è stata riscontrata positività immunoistochimica nei confronti della PrP^{Sc} in 2 dei 7 campioni di ghiandola surrenale oggetto d'indagine (Figg. nn. 39 e 40). I due succitati campioni positivi provenivano da animali abbattuti a 475 e 479 giorni dall'inizio della sperimentazione, vale a dire nelle fasi terminali della stessa, contraddistinte appunto dalla simultanea presenza di manifestazioni clinico-neurologiche conclamate.

Quattro campioni sono risultati non leggibili, mentre uno solo è risultato negativo.

I risultati relativi alla presenza/assenza di PrP^{Sc} a livello dei tessuti prelevati dagli ovini inclusi nella sperimentazione vengono riportati nelle Tabelle n. 6 e n.7.

Tabella n. 6: risultati delle indagini immunohistochimiche effettuate sulle ghiandole surrenali di ovini di razza Sarda infettati *per os*. Si può notare come la prima positività risulti evidente a 20 mesi p.i.

OVINO	TEMPO P.I.	GENOTIPO	VIA DI INOCULAZIONE	TESSUTO	ESITO IHC
211/149	1,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/84	3,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/85	3,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/78	3,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/92	6,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/95	6,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/106	6,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/121	9 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/79	12 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/89	12 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/100	12 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/91	12 MESI	ARQ/AHQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/86	14,5 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/128	16 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/122	16 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/151	20 MESI	ARQ/ARQ	<i>Per os</i>	SURRENE	MOLTO POSITIVO
211/134	20 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	POSITIVO
211/140	20 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/113	20 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	POSITIVO
211/143	24 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	POSITIVO
211/165	24 MESI	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	POSITIVO
211/114	740gg a termine	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	MOLTO POSITIVO
211/131	843gg a termine	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	POSITIVO
211/141	1050gg a termine	ARQ/AHQ	<i>per os</i>	SURRENE	MOLTO POSITIVO
211/154	1090gg a termine	ARQ/AHQ	<i>per os</i>	SURRENE	MOLTO POSITIVO
211/172	1338gg a termine	ARQ/AHQ	<i>per os</i>	SURRENE	MOLTO POSITIVO
211/111	2013gg	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	NEGATIVO
211/130	Sintomatico	ARQ/ARQ	<i>per os</i>	SURRENE	MOLTO POSITIVO

Tabella n. 7: risultati delle indagini immunoistochimiche effettuate sulle ghiandole surrenali di ovini di razza sarda inoculati per via intracerebrale.

OVINO	TEMPO P.I.	GENOTIPO	VIA DI INOCULAZIONE	TESSUTO	ESITO IHC
211/8	475gg a termine	ARQ/ARQ	INTRACEREBRALE	SURRENE	+ (unico campo)
211/2	479gg a termine	ARQ/ARQ	INTRACEREBRALE	SURRENE	POSITIVO
211/22	671gg a termine	ARQ/ARQ	INTRACEREBRALE	SURRENE	NON LEGGIBILE
211/30	712gg a termine	ARQ/ARQ	INTRACEREBRALE	SURRENE	NON LEGGIBILE
211/29	713gg a termine	ARQ/ARQ	INTRACEREBRALE	SURRENE	NON LEGGIBILE
211/38	790gg a termine	ARQ/ARQ	INTRACEREBRALE	SURRENE	NON LEGGIBILE
211/40	1292gg a termine	ARQ/ARQ	INTRACEREBRALE	SURRENE	NEGATIVO

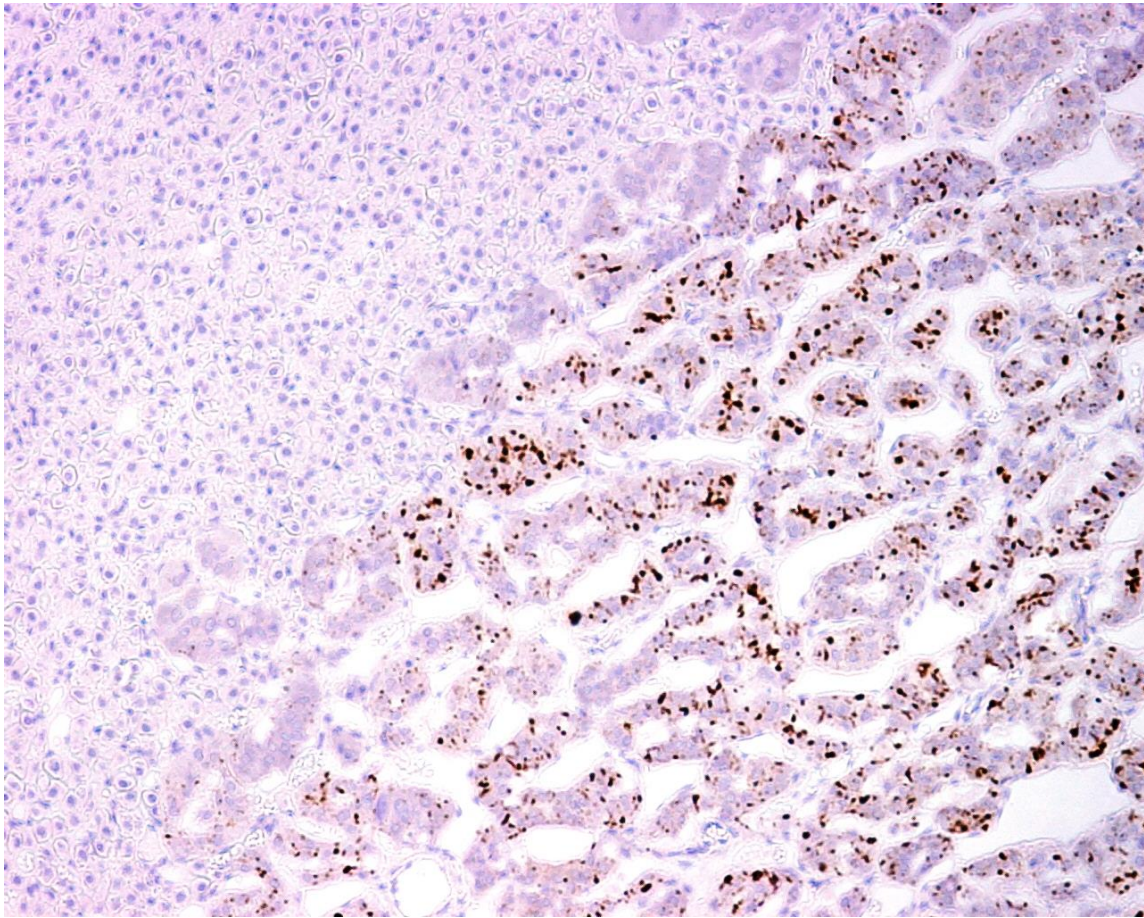


Fig. n. 31: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Piccolo ingr (Foto: G Marruchella).

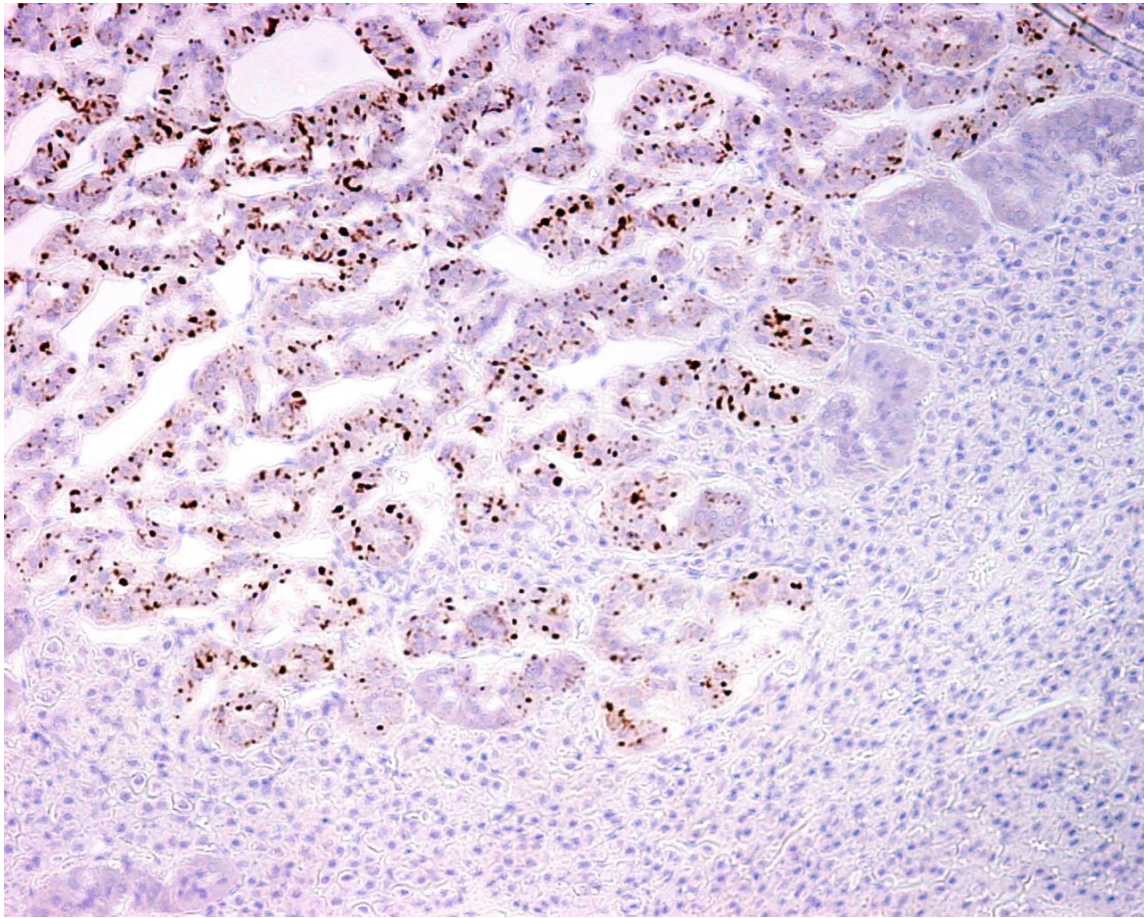


Fig. n. 32: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Piccolo ingr (Foto: G Marruchella).

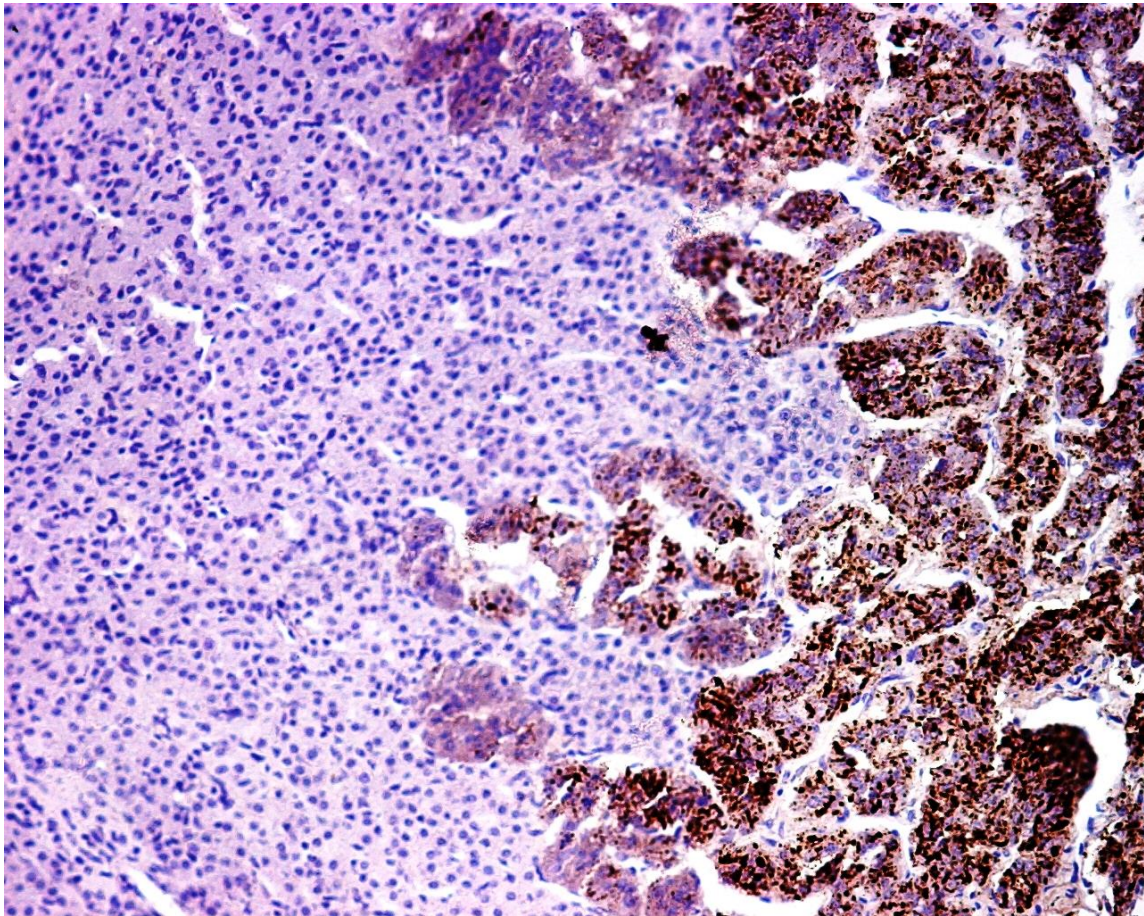


Fig. n. 33: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Intensa deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Piccolo ingr (Foto: G Marruchella).

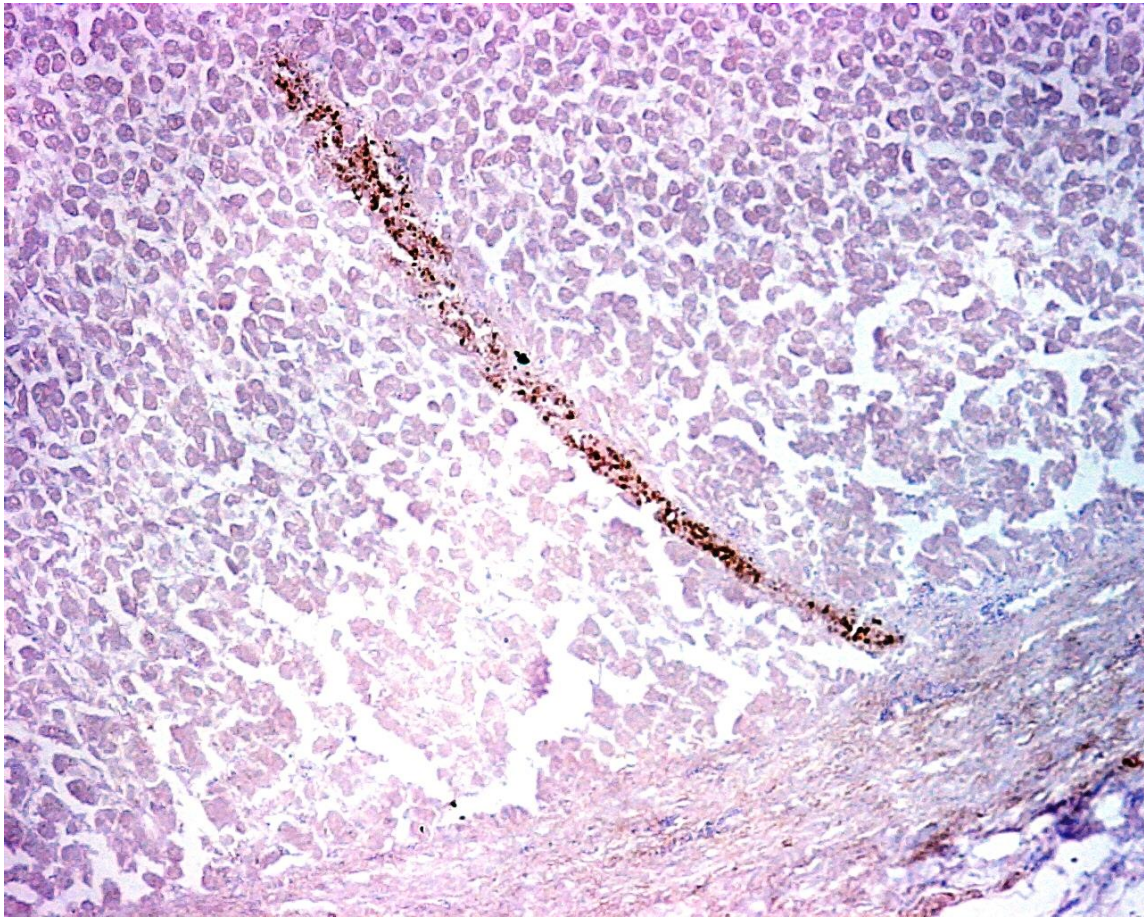


Fig. n. 34: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Piccolo ingr (Foto: G Marruchella).

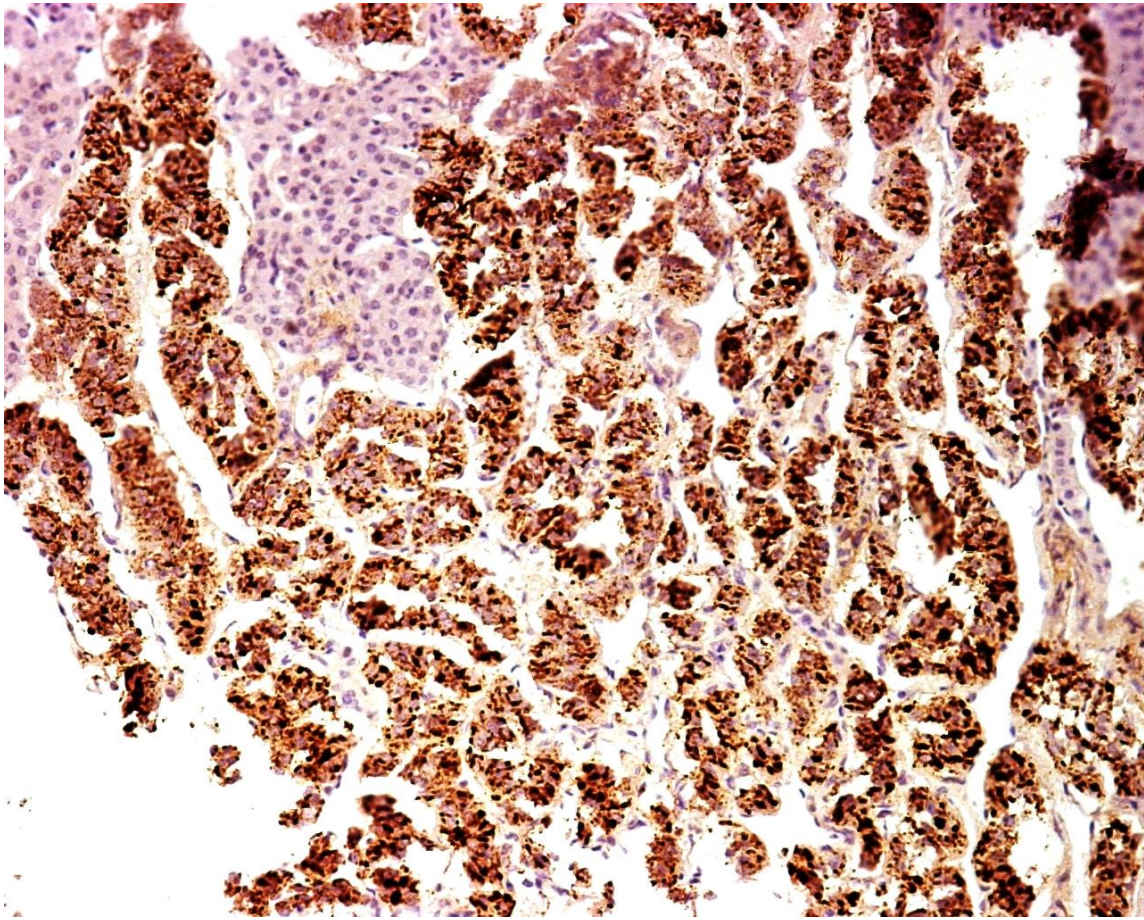


Fig. n. 35: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Intensa deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Piccolo ingr (Foto: G Marruchella).

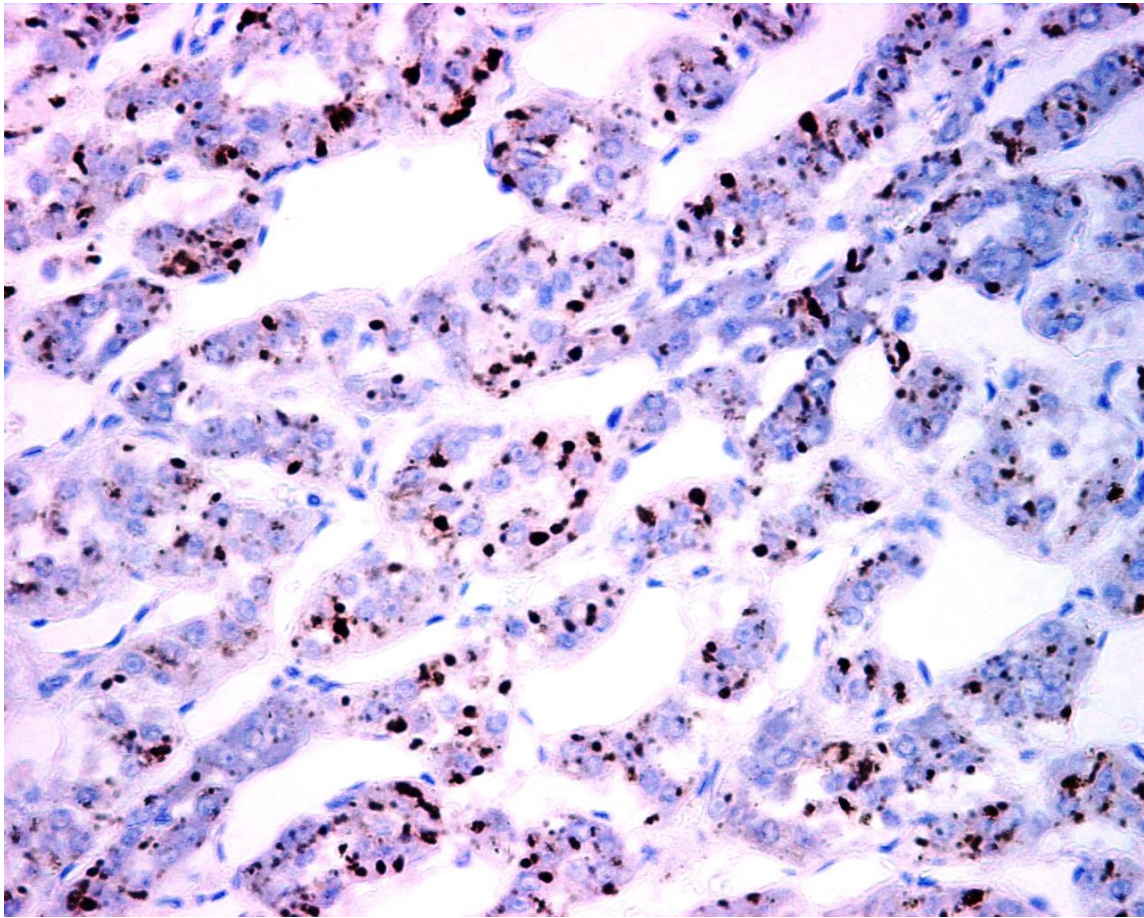


Fig. n. 36: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Medio ingr (Foto: G Marruchella).

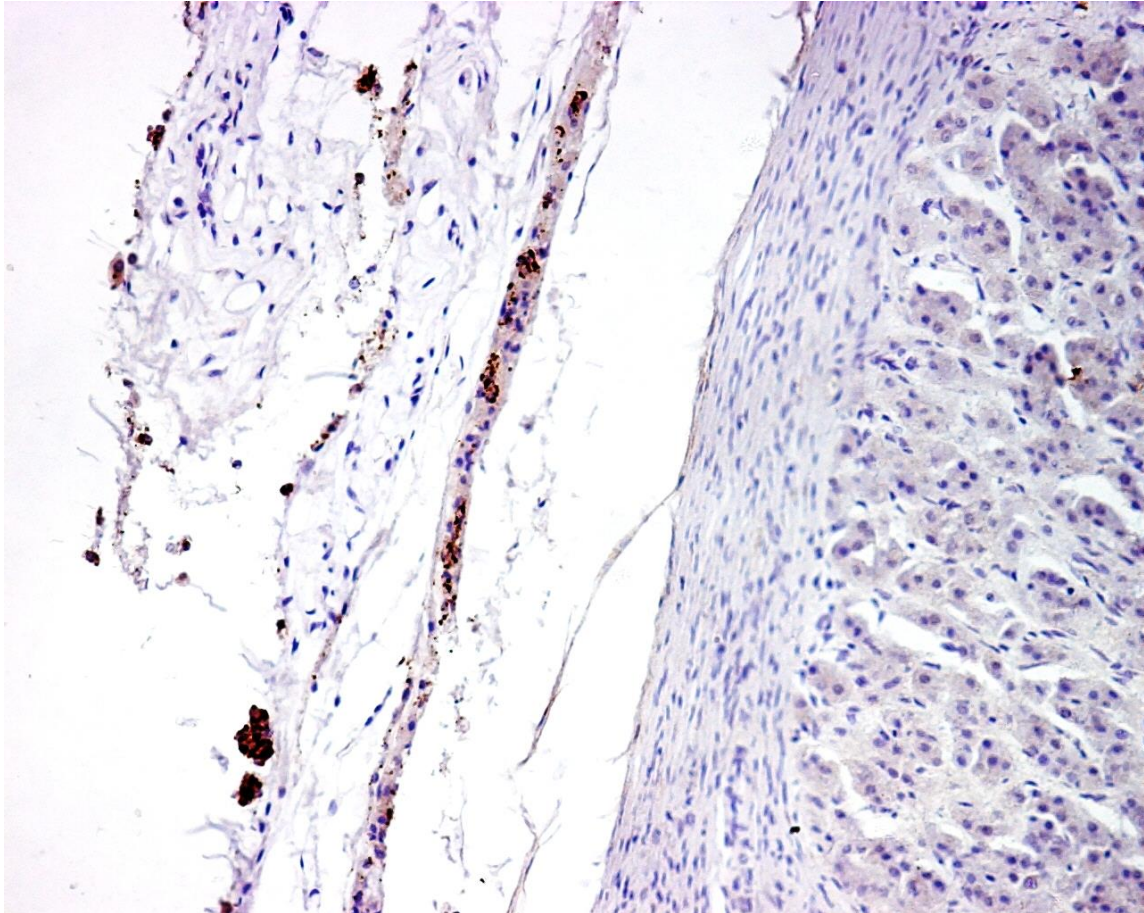


Fig. n. 37: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Deposizione di PrP^{Sc} a livello di fibre nervose subcapsulari. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Piccolo ingr (Foto: G Marruchella).

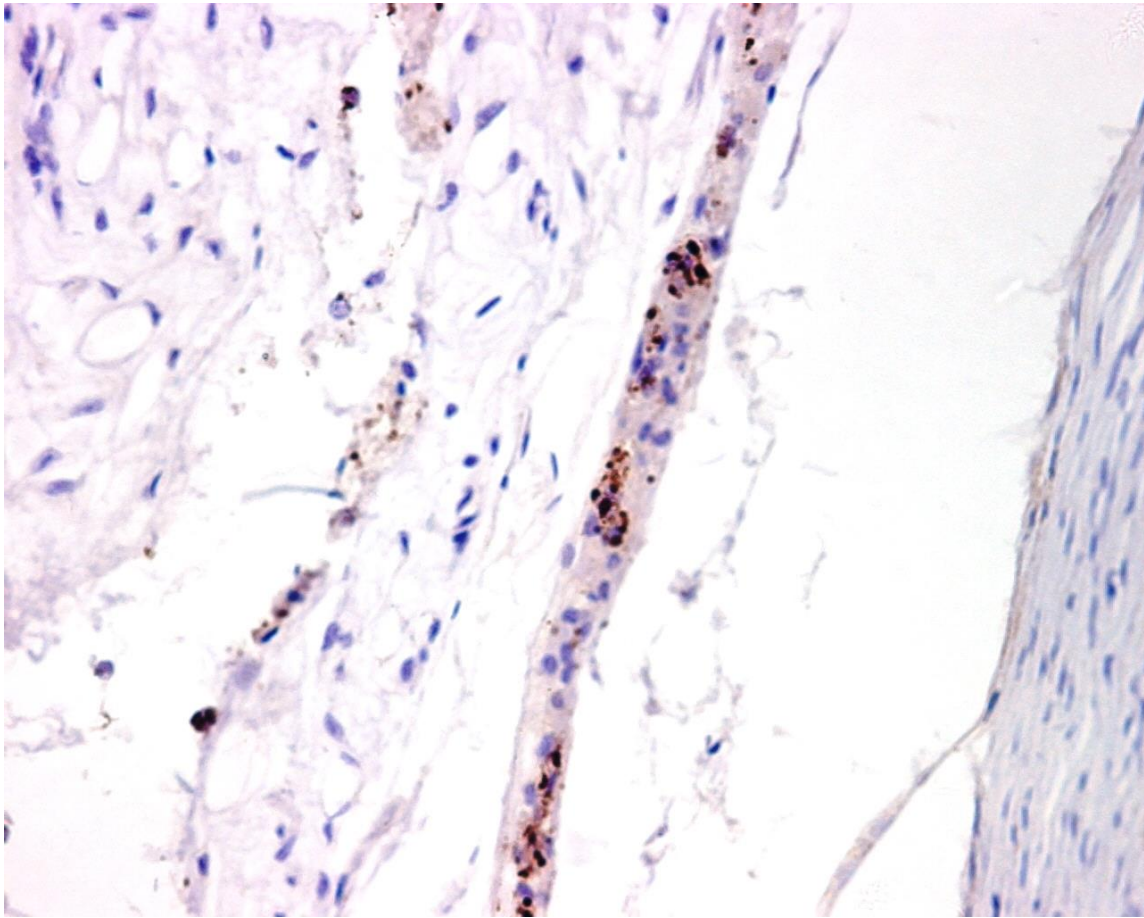


Fig. n. 38: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Deposizione di PrP^{Sc} a livello di fibre nervose subcapsulari. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Medio ingr (Foto: G Marruchella).

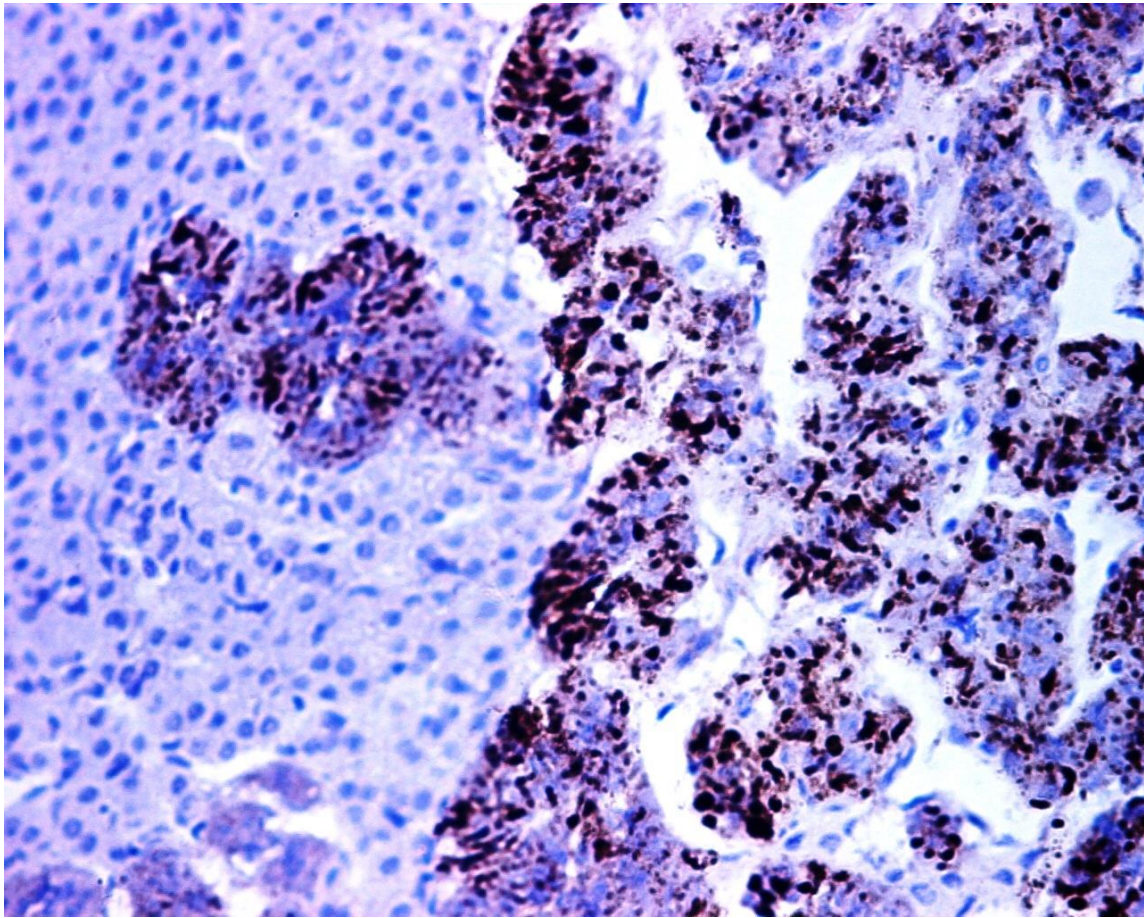


Fig. n. 39: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Medio ingr (Foto: G Marruchella).

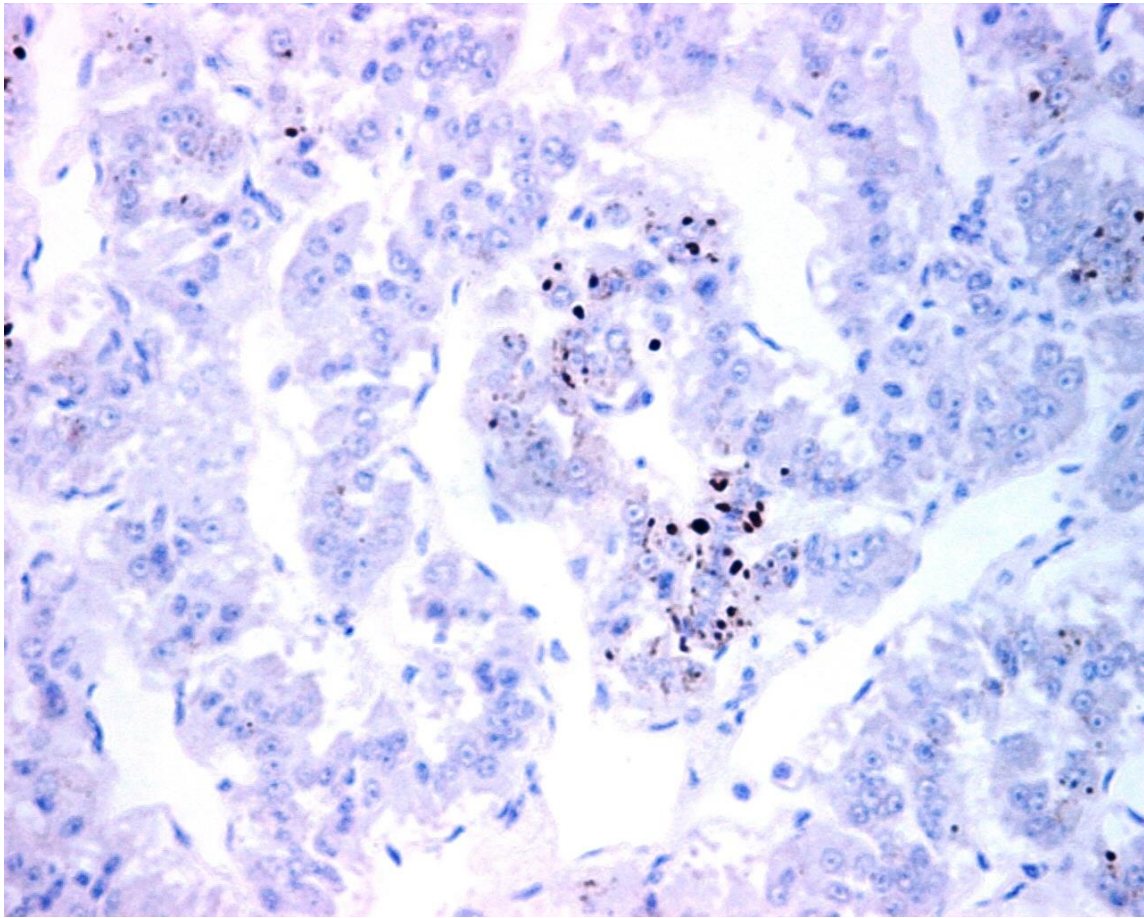


Fig. n. 41: Ovino. Ghiandola surrenale. Scrapie. Leggera deposizione di PrP^{Sc} a livello della midollare. Immunoistochimica per la ricerca della PrP^{Sc} mediante l'impiego dell'anticorpo primario F99/97.6.1. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer. Medio ingr (Foto: G Marruchella).

2.4.2 Indagini immunobiochimiche (*Western Blotting*)

Le indagini immunoistochimiche effettuate ai fini della ricerca della PrP^{Sc} nei tessuti campionati provenienti dagli ovini inclusi nella sperimentazione sono stati confermati con le indagini in WB.

Il Wb ha evidenziato la presenza di PrP^{Sc} in tutti gli ovini oggetto di studio, a conferma della maggiore sensibilità del test.

2.5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati sopra esposti, appare lecito affermare che la ghiandola surrenale e, più nello specifico, la sua regione midollare, sia ampiamente coinvolta nella patogenesi dell'infezione prionica in corso di Scrapie sperimentale nell'ovino di razza Sarda, in analogia con quanto già riportato in letteratura (Wight, 1961; Field, 1969). Appare parimenti lecito affermare, nonché oltremodo plausibile sul piano biologico, che il succitato coinvolgimento si realizzi per via ortosimpatica, viste e considerate le connessioni neuro-anatomiche del surrene con il SNA, di cui sé già riferito in precedenza (Hoshi, 1926; Hollinshead, 1937; Coupland, 1965; Lewis & Shute, 1969; Coupland et al. 1989; Parker et al. 1990b; Watanabe et al., 1990; Oomori et al. 1991). Tuttavia, dal momento che trattasi di una ghiandola endocrina, si ritiene altrettanto plausibile un contestuale coinvolgimento della medesima anche per via ematogena, considerata la rilevanza che l'utilizzo di tale via avrebbe nel processo di neuroinvasione prionica, di cui si è già detto in precedenza. Rimangono da chiarire, tuttavia, sia la precisa cinetica evolutiva del processo di coinvolgimento della midollare del surrene, sia il ruolo che la successiva diffusione "centrifuga" dell'agente prionico, a partire dal SNC già colonizzato ad opera dello stesso, potrebbe rivestire nell'ulteriore coinvolgimento della ghiandola stessa.

Studi precedenti effettuati su altri modelli sperimentali avevano già documentato il coinvolgimento del sistema endocrino dell'ospite nella patogenesi della Scrapie. Ci si riferisce, in particolar modo, al coinvolgimento del pancreas endocrino (Carp et al., 1989). A tal proposito, sarebbe interessante documentare se l'attività funzionale endocrina dei succitati distretti tissutali dell'ospite possa risultare compromessa in corso d'infezione, al di là del fatto che non siano state osservate lesioni microscopiche, come documentato anche nel nostro studio.

Ulteriori indagini finalizzate all'approfondimento del ruolo della ghiandola surrenale e, segnatamente, della sua regione midollare, nella patogenesi della Scrapie e, più in generale, delle malattie prioniche animali ed umane appaiono assolutamente indispensabili.

2.6 BIBLIOGRAFIA

- Acín C., Martín-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzón M., Bolea R., Smith A., Rodellar C., Badiola JJ., Zaragoza P. (2004) Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol* **85 (Pt 7)**: 2103-10.
- Acutis PL., Colussi S., Santagada G., Laurenza C., Maniaci MG., Riina MV., Peletto S., Goldmann W., Bossers A., Caramelli M., Cristoferi I., Maione S., Sacchi P., Rasero R. (2008) Genetic variability of the PRNP gene in goat breeds from Northern and Southern Italy. *J Appl Microbiol* **104 (6)**: 1782-9.
- Agrimi U., Ru G., Cardone F., Pocchiari M., Caramelli M. (1999) Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet* **353 (9152)**: 560-1.
- Agrimi U., Conte M., Morelli L., Di Bari MA., Di Guardo G., Ligios C., Antonucci G., Aufiero GM., Pozzato N., Mutinelli F., Nonno R., Vaccari G. (2003) Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies and Genetics. *Vet Res Comm* **24**: 31-38.
- Agrimi U., Nonno R., Dell'Omo G., Di Bari MA., Conte M., Chiappini B., Esposito E., Di Guardo G., Windl O., Vaccari G., Lipp HP. (2008) Prion protein aminoacid determinants of differential susceptibility and molecular feature of prion strains in mice and voles. *PLoS Pathog* **4 (7)**: e1000113.
- Aguzzi A. (2003) Prions and the immune system: a journey through gut, spleen, and nerves. *Adv Immunol* **81**: 123-71.
- Aguzzi A. & Hardt WD. (2003) Dangerous liaisons between a microbe and the prion protein.
- Aguzzi A. & Heikenwalder M. (2006) Pathogenesis of prion diseases: Current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol* **4**: 765-775.
- Aguzzi A., Heikenwalder M., Polymenidou M. (2007) Insight into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cel Biol* **8**: 552-561

- Aguzzi A. & Heppner FL. (2000) Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ* **7**: 899-902.
- Aguzzi A. & Polymenidou M. (2004) Mammalian prion biology. One century of evolving concepts. *Cell* **116**: 313-327.
- Aguzzi A. (2007) Prion biology: the quest for the test. *Nat Med* **4**: 614-616.
- Albanese V., Lawson VA., Hill AF., Cappai R., Di Guardo G., Staikopoulos V., Thacker M., Furness JB., Chiocchetti R. (2008) Evidence for prion protein expression in enteroglial cells of the myenteric plexus of mouse intestine. *Auton Neurosci* **140 (1-2)**: 17-23.
- Alpert LK. (1931) Innervation of suprarenal gland. *Anatomical Record* **50**: 221-234.
- Alvarez L., Arranz JJ., San Primitivo F. (2006) Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep. *J Anim Sci* **84 (2)**: 259-65.
- Alverson J., O'Rourke KI., Baszler T. (2006) PrP^{Sc} accumulation in fetal cotyledons of scrapie-resistant lambs is influenced by fetus location in the uterus. *J Gen Virol* **87**: 1035–1041.
- Andréoletti O¹, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F. (2000) Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* **81 (Pt 12)**: 3115-26.
- Andréoletti O., Lacroux C., Chabert A., Monnereau L, Tabouret G., Lantier F., Berthon P., Eychenne F., Lafond-Benestad S., Elsen JM, Schelcher F. (2002) PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol* **83 (Pt 10)**: 2607-16.
- Andréoletti O., Orge L., Benestad SL., Beringue V., Litaise C., Simon S., Le Dur A., Laude H., Simmons H., Lugan S., Corbière F., Costes P., Morel N., Schelcher F., Lacroux C. (2011) Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog* **7 (2)**: e1001285.

- Andréoletti O., Litaïse C., Simmons H., Corbière F., Lugan S., Costes P., Schelcher F., Vilette D., Grassi J., Lacroux C. (2012) Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathog* **8** (6): e1002782.
- Angers RC., Browning SR., Seward TS., Sigurdson CJ., Miller MW., Hoover EA., Telling GC. (2006) Prions in Skeletal Muscles of Deer with Chronic Wasting Disease. *Science* **311** (5764): 1117.
- Atkinson CJ., Zhang K., Munn AL., Wiegmanns A., Wei MQ. (2015) Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion* **9** (4): 1-35.
- Aucouturier P., Geissmann F., Damotte D. Saborio GP., Meeker HC., Kasczak R., Kasczak R. Carp R.I, Wisniewski T. (2001) Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest* **108**(5): 703-8.
- Avbelj M., Hafner-Bratkovic I., Jerala R. (2011) Introduction of glutamines into the B2-H2 loop promoter prion protein conversion. *Biochem Biophys Res Commun* **413** (4): 521-6.
- Babelhadj B., Di Bari MA., Pirisinu L., Chiappini B., Gaouar SBS., Riccardi G., Marcon S., Agrimi U., Nonno R., Vaccari G. (2018) Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis* **24**(6): 1029-1036.
- Baldauf E., Beekes M., Diringer H. (1997) Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* **78** (Pt 5): 1187-97.
- Baral PK., Swayampakula M., Aguzzi A., James MNG.(2015) X-ray structural and molecular dynamical studies of the globular domains of cow, deer, elk and Syrian hamster prion proteins. *J Struct Biol* **192** (1): 37-47.
- Barclay GR., Houston EF., Halliday SI., Farquhar CF., Turner ML. (2002) Comparative analysis of normal prion protein expression on human, rodent, and ruminant blood cells by using a panel of prion antibodies. *Transfusion* **42** (5): 517-26.

- Barone R. (1981) Anatomia comparata dei mammiferi domestici. Volume 4: splancnologia: apparecchio uro-genitale, feto e suoi annessi, peritoneo e topografia addominale, p 703, 732, 750, 766. Bologna: Edagricole.
- Barria MA., Telling GC., Gambetti P., Mastrianni J., Soto C. (2011) Generation of a new form of human PrP^{Sc} in vitro by interspecies transmission from cervid prions. *J Biol Chem* **286**: 7490-5.
- Baylis M., Chihota C., Stevenson E., Goldmann W., Smith A., Sivam K., Tongue S. (2004) Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *J Gen Virol* **85 (Pt 9)**: 2735-40.
- Baylis M. & Goldmann W. (2004) The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med* **4 (4)**: 385-96
- Beckman D., Santos LE., Americo TA., Ledo JH., de Mello FG., Linden R. (2015) Prion Protein Modulates Monoaminergic Systems and Depressive-like Behavior in Mice. *J Biol Chem* **290 (33)**: 20488-98.
- Beekes M., Baldauf E., Diringer H. (1996) Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* **77(Pt 8)**: 1925-34.
- Beekes M., McBride PA., Baldauf E. (1998) Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol* **79 (Pt 3)**: 601-7.
- Beekes M & McBride PA. (2000) Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* **278 (3)**: 181-4.
- Beekes M & McBride PA. (2007) The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J* **274 (3)**: 588-605.
- Belt PB., Muileman IH., Schreuder BE., Bos-de Ruijter J., Gielkens AL., Smits MA. (1995) Identifications of five allelic variant of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol* **76 (Pt 3)**: 509-517.
- Benestad SL., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M.A., Bratberg, B. (2003) Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* **153**: 202-8.

- Benestad SL., Arsac JN., Goldmann W., Noremark M. (2008) Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res* **39**: 19.
- Beringue V., Demoy M., Lasmezas CI., Gouritin B., Weingarten C., Deslys J.-P., Andreux JP., Couvreur P., Dormont D. (2000) Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol* **190**: 495–502.
- Bessen RA., Marsh RF. (1992) Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* **66**: 2096-2101.
- Bessen RA., Marsh RF. (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**: 7859-7868.
- Biacabe A.G., Laplanche JL., Ryder S., and Baron T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* **5**: 110-115.
- Biacabe A.G., Morignat E., Vulin J., Calavas D., and Baron TG. (2008) Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* **14**: 298-300.
- Billinis C., Panagiotidis CH., Psychas V., Argyroudis S., Nicolaou A., Leontides S., Papadopoulos O., Sklaviadis T. (2002) Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol* **83 (Pt 3)**: 713-21.
- Billinis C., Psychas V., Leontides L., Spyrou V., Argyroudis S., Vlemmas I., Leontides S., Sklaviadis T., Papadopoulos O. (2004) Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol* **85 (Pt 2)**: 547-54.
- Blanquet-Grossard F., Thielens NM., Vendrely C., Jamin M., Arlaud GJ. (2005) Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* **44 (11)**: 4349-56.
- Bolea R., Hortells P., Martín-Burriel I., Vargas A. Ryffel B., Monzón M., Badiola JJ. (2010) Consequences of dietary manganese and copper imbalance on neuronal apoptosis in a murine model of scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* **36 (4)**: 300-11.
- Bollinger T., Caley P., Merrill E., Messier F., Miller MW., Samuel MD., Vanopdenbosch E. (2004) Chronic Wasting Disease in Canadian Wildlife: An

Expert Opinion on the Epidemiology and Risks to Wild Deer. *A report submitted to the Canadian Cooperative Wildlife Health Center.*

- Bons N., Lehmann S., Mestre-Frances N., Dormont D., Brown P. (2002) Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion* **42 (5)**: 513-6.
- Bounhar Y., Zhang Y., Goodyer C., LeBlanc A.(2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **276 (42)**: 39145–9.
- Bradford BM., Reizis B., Mabbott NA. (2017) Oral Prion Disease Pathogenesis Is Impeded in the Specific Absence of CXCR5-Expressing Dendritic Cells. *J Virol* **91 (10) pii**: e00124-17.
- Bradley RM., Mistretta CM.(1973) Swallowing in fetal sheep. *Science* **179**: 1016–1017.
- Brandner S., Isenmann S., Raeber A., Fisher M., Sailer A., Kobayashi Y., Marino S., Weissmann C., Aguzzi A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie induced neurotoxicity. *Nature* **379**: 339-343.
- Brown DR. (2001): Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* **24**: 85-90.
- Brown KL., Stewart K., Ritchie DL., Mabbott NA., Williams A., Fraser H., Morrison WI., Bruce ME. (1999) Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* **5 (11)**: 1308-12.
- Brown KL, Gossner A., Mok S., Mabbott NA. (2012) The effects of host age on the transport of complement-bound complexes to the spleen and the pathogenesis of intravenous scrapie infection. *J Virol* **86 (1)**: 25-35.
- Brown KL., Mabbott NA. (2014) Evidence of subclinical prion disease in aged mice following exposure to bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* **95 (Pt 1)**: 231-43.
- Brown P., Gajdusek DC. (1991) Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* **337(8736)**: 269-70.
- Brown P., Rohwer RG., Dunstan BC, MacAuley C., Gajdusek DC., Drohan WN. (1998) The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives

in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* **38 (9)**: 810-6.

- Brown P., Cervenakova L., McShane LM., Barber P., Rubenstein R., Drohan WN. (1999) Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion* **39 (11)**: 1169-78.
- Bruce ME., Fraser H. (1991) Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* **172**: 125-138.
- Bruce M.E. (1993) Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* **49**: 822-838
- Bruce ME., Will RG., Ironside JW., McConnel I., Drummond D., Suttle A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock CJ. (1997) Transmission to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389 (6650)**: 489-501.
- Bruce ME. (2003) TSE strain variation. *Br Med Bull* **66**: 99-108.
- Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner RA., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**: 1339-1347.
- Bueler H., Fisher M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp HP., De Armond SJ., Prusiner SB., Aguet M., Weissmann C. (1992) Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356 (6370)**: 557-582.
- Burns A. & Iliffe S. (2009) Alzheimer’s disease Vol. **338**.
- Burton GJ., Samuel CA., Steven DH (1976) Ultrastructural studies of the placenta of the ewe: phagocytosis of erythrocytes by the chorionic epithelium at the central depression of the cotyledon. *Qu J Exp Phys* **61**: 275–286.
- Burwinkel M., Riemer C., Schwarz A., Schultz J., Neidhold S, Bamme T., Baier M. (2004) Role of cytokines and chemokines in prion infections of the central nervous system. *Int J Dev Neurosci* **22 (7)**: 497-505.
- Buschmann A., Biacabe AG., Ziegler U., Bencsik A., Madec JY., Erhardt G., Lühken G., Baron T., Groschup MH. (2004) Atypical scrapie cases in

Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods* **117 (1)**: 27-36.

- Buschmann A., Gretzschel A., Biacabe AG., Schiebel K., Corona C., Hoffmann C., Eiden M., Baron T., Casalone C., Groschup MH. (2006) Atypical BSE in Germany-proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol* **117**: 103-116.
- Carp RI., Callahan SM. (1982) Effect of mouse peritoneal macrophages on scrapie infectivity during extended in vitro incubation. *Intervirology* **17 (4)**: 201-7.
- Carp RI., Kim YS., Callahan SM. (1989) Scrapie-induced alterations in glucose tolerance in mice. *J Gen Virol* **70(Pt 4)**: 827-35.
- Carp RI., Meeker H., Sersen E., Kozlowski P. (1998) Analysis of the incubation periods, induction of obesity and histopathological changes in senescence-prone and senescence-resistant mice infected with various scrapie strains. *J Gen Virol* **79 (Pt 11)**: 2863-9.
- Casalone C., Zanusso G., Acutis P., Ferrari S., Capucci L., Tagliavini F., Monaco S., and Caramelli M. (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3065-3070.
- Castilla J., Morales R., Saà P., Barria M., Gambetti P., Soto C. (2008) Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J* **27 (19)**: 2557-2566.
- Castro-Seoane R., Hummerich H., Sweeting T., Tattum MH., Linehan JM., Fernandez de Marco M., Brandner S., Collinge J., Klöhn PC. (2012) Plasmacytoid dendritic cells sequester high prion titres at early stages of prion infection. *PLoS Pathog* **8 (2)**: e1002538.
- Caughey B., Baron GS. (2006) Prions and their partners in crime. *Nature* **443 (7113)**: 803-10.
- Cazaubon S., Viegas P., Couraud PO. (2007) Functions of prion protein PrPC. *Med Sci* **23 (8-9)**: 741-5.
- Cervenakova L., Yakovleva O., McKenzie C., Kolchinsky S., McShane L., Drohan WN., Brown P. (2003) Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-

derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* **43 (12)**: 1687-94.

- Chiarini LB., Freitas AR., Zanata SM., Brentani RR., Martins VR., Linden R. (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo j* **21 (13)**: 3317-26.
- Chiesa R., Piccardo P., Dossena S., Nowoslawski L., Roth KA., Ghetti B., Harris DA. (2005) Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102 (1)**: 238-43.
- Chiocchetti R., Mazzuoli G., Albanese V., Mazzoni M., Clavenzani P., Lalatta-Costerbosa G., Lucchi ML., Di Guardo G., Marruchella G., Furness JB. (2008) Anatomical evidence for ileal Peyer's patches innervation by enteric nervous system: a potential route for prion neuroinvasion? *Cell Tissue Res* **332 (2)**: 185-94.
- Chong AKI., Kennedy I., Goldmann W., Green A., González L., Jeffrey M., Hunter N. (2015) Archival search for historical atypical scrapie in sheep reveals evidence for mixed infections. *J Gen Virol* **96(10)**: 3165-78.
- Comincini S., Foti MG., Tranulis MA., Hills D., Di Guardo G., Vaccari G, Williams JL., Harbitz I., Ferretti L. (2001) Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND). *Mamm Genome* **12 (9)**: 729-33.
- Cook RW., Bingham J., Besier AS., Bayley CL., Hawes M., Shearer PL., Yamada M., Bergfeld J., Williams DT., Middleton DJ. (2016) Atypical scrapie in Australia. *Aust Vet J* **94 (12)**: 452-455.
- Cockcroft PD., Clark AM. (2006) The Shetland Islands scrapie monitoring and control programme: analysis of the clinical data collected from 772 scrapie suspects 1985-1997. *Res Vet Sci* **80 (1)**: 33-44.
- Collinge J., Palmer MS., Silde kc., Hill Af., Gowland I., Meads J., Asante E., Bradley R., Doey LJ., Lantos PL. (1995) Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* **378 (6559)**: 779-83.

- Collinge J., Sidl, KC., Meads J., Ironside J., Hill AF. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature* **383**: 685-690.
- Cordier-Dirikoc S., Chabry J. (2008) Temporary depletion of CD11c+ dendritic cells delays lymphoinvasion after intraperitoneal scrapie infection. *J Virol* **82** (17): 8933-6.
- Corona C., Porcario C., Martucci F., Iulini B., Manea B., Gallo M., Palmitessa C., Maurella C., Mazza M., Pezzolato M., Acutis P., Casalone C. (2009) Olfactory system involvement in natural scrapie disease. *J Virol* **83** (8): 3657-67.
- Cosseddu GM, Agrimi U., Pinto J., Schudel AA. (2007) Advances in scrapie research. *Rev Sci Tech* **26** (3): 657-68.
- Cosseddu GM., Nonno R., Vaccari G., Bucalossi C., Fernandez-Borges N., Di Bari MA., Castilla J., Agrimi U. (2011) Ultra-efficient PrP^{Sc} amplification highlights potentialities and pitfalls of PMCA technology. *PLoS Path* **7** (11): e12370.
- Coullier M., Messiaen S., Hamel R., Fernández de Marco M., Lilin T., Eloit M. (2006) Bax deletion does not protect neurons from BSE-induced death. *Neurobiol Dis* **23** (3): 603-11.
- Coupland RE. (1965) Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *J Anat* **99** (Pt 2): 255-72.
- Coupland RE, Parker TL., Kesse WK., Mohamed AA. (1989) The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation. *J Anat* **163**: 173-81.
- Courageot MP., Daude N., Nonno R., Pageut S., Di Bari MA., Le Dur A., Chapuis J., Hill AF., Agrimi U., Laude H., Villette D. (2008) A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol* **89** (1): 341-7.
- Couzin-Frankel (2011) The prion heretic. *Science* **332** (6033): 1024-1027.
- Cravero G., Guarda F., Dotta F., Guglielmino R. (1977) La scrapie in pecore di razza Biellese. Prima segnalazione in Italia. *La Clinica Veterinaria* **100**: 1-14.
- Crowell J., Wiley JA., Bessen RA. (2015) Lesion of the olfactory epithelium accelerates prion neuroinvasion and diseaseonset when prion replication is restricted to neurons. *PLoS One* **10** (3): e0119863.

- D'Angelo A., Maurella C., Bona C., Borrelli A., Caramelli M., Careddu ME., Jaggy A., Ru G. (2007) Assessment of clinical criteria to diagnose scrapie in Italy. *Vet J* **174** (1): 106-12.
- Dassanayake RP., Schneider DA., Herrmann-Hoesing LM., Truscott TC., Davis WC., O'Rourke KI. (2012) Cell-surface expression of PrPC and the presence of scrapie prions in the blood of goats. *J Gen Virol* **93** (Pt 5): 1127-31.
- Davies GA., Bryant AR., Reynolds JD., Jirik FR., Sharkey KA. (2006) Prion diseases and the gastrointestinal tract. *Can J Gastroenterol* **20** (1): 18-24.
- De Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, E Silva PM, Martins MA, Linden R. (2005) The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol* **77** (2): 238-46.
- De Bosschere H., Roels S., Benestad SL, Vanopdenbosch E. (2004) Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec* **155** (22): 707-8.
- Defaweux V., Dorban G., Demonceau C., Piret J., Jolois O., Thellin O., Thielen C., Heinen E., Antoine N. (2005) Interfaces between dendritic cells, other immune cells, and nerve fibres in mouse Peyer's patches: potential sites for neuroinvasion in prion diseases. *Microsc Res Tech* **66** (1): 1-9.
- Dellmann HD & Eurell JA. (2005) Istologia e anatomia microscopica veterinaria. *Casa Editrice Ambrosiana*.
- Denkers ND., Telling GC., Hoover EA. (2011) Minor oral lesions facilitate transmission of chronic wasting disease. *J Virol* **85** (3): 1396-9.
- Denzer K., Kleijmeer MJ., Heijnen HF., Stoorvogel W., Geuze HJ. (2000a) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* **113** (Pt 19): 3365-74.
- Denzer K., van Eijk M., Kleijmeer MJ., Jakobson E, de Groot C., Geuze HJ. (2000b) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* **165** (3): 1259-65.
- Demonceau C., Piret J., Zorzi D., Thellin O., Heinen E. Close interactions between sympathetic neural fibres and follicular dendritic cells

- network are not altered in Peyer's patches and spleen of C57BL/6 mice during the preclinical stage of 139A scrapie infection. (2014) *J Neuroimmunol* **272 (1-2)**: 1-9.
- Detwiler LA. & Baylis M. (2003) The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech* **22 (1)**: 121-43.
 - Dexter G., Tongue SC., Heasman L., Bellworthy SJ., Davis A., Moore SJ., Simmons MM., Sayers AR., Simmons HA., Matthews D. (2009) The evaluation of exposure risks for natural transmission of scrapie within an infected flock. *BMC Vet Res* **5**: 38.
 - Dickinson A., Young G., Stamp J., Renwick C. Scrapie: Experiments involving maternal transmission in sheep. United States Department of Agriculture (USDA) Report of Scrapie Seminar *ARS* **91-53**: 244-8.
 - Didier A., Gebert R., Dietrich R., Schweiger M., Gareis M., Märtlbauer E., Amselgruber WM. (2008) Cellular prion protein in mammary gland and milk fractions of domestic ruminants. *Biochem Biophys Res Commun* **369 (3)**: 841-4.
 - Di Guardo G. & Agrimi U. (1993) Apoptosis and subacute spongiform encephalopathies. *Res Virol* **144 (5)**: 409-10.
 - Di Guardo G. (2015) Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili. In: Marcato P.S., *Patologia Sistematica Veterinaria, II Edizione, Edagricole. Il Sole 24 Ore/New Business Media*, Volume 2: 1355-1365.
 - Donaldson DS., Kobayashi A., Ohno H., Yagita H., Williams IR., Mabbott NA. (2012) M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol* **5 (2)**: 216-25.
 - Donaldson DS., Else KJ., Mabbott NA. (2015) The Gut-Associated Lymphoid Tissues in the Small Intestine, Not the Large Intestine, Play a Major Role in Oral Prion Disease Pathogenesis. *J Virol* **89 (18)**: 9532-47.
 - Donaldson DS., Sehgal A., Rios D., Williams IR., Mabbott NA. (2016) Increased Abundance of M Cells in the Gut Epithelium Dramatically Enhances Oral Prion Disease Susceptibility. *PLoS Pathog* **12 (12)**: e1006075.
 - Dorban G., Defaweux V., Demonceau C., Flandroy S., Van Lerberghe PB., Falisse-Poirrier N., Piret J., Heinen E., Antoine N. (2007a)

- Interaction between dendritic cells and nerve fibres
in lymphoid organs after oral scrapie exposure. *Virchows Arch* **451 (6)**: 1057-65.
- Dorban G., Defaweux V., Levavasseur E., Demonceau C., Thellin O., Flandroy S., Piret J., Falisse N., Heinen E., Antoine N. (2007b) Oral scrapie infection modifies the homeostasis of Peyer's patches' dendritic cells. *Histochem Cell Biol* **128 (3)**: 243-51.
 - Douet JY., Zafar S., Perret-Liaudet A., Lacroux C., Lugan S., Aron N., Cassard H., Ponto C., Corbière F., Torres JM, Zerr I., Andreoletti O. (2014) Detection of infectivity in blood of persons with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerg Infect Dis* **20 (1)**: 114-7.
 - Douet JY., Lacroux C., Litaie C., Lugan S., Corbière F., Arnold M., Simmons H., Aron N., Costes P., Tillier C., Cassard H., Andréoletti O. (2016) Mononucleated Blood Cell Populations Display Different Abilities To Transmit Prion Disease by the Transfusion Route. *J Virol* **90 (7)**: 3439-45.
 - Edwards JC., Moore SJ., Hawthorn JA., Neale MH., Terry LA. (2010) PrP(Sc) is associated with B cells in the blood of scrapie-infected sheep. *Virology* **405 (1)**: 110-9.
 - Eghiaian F., Grosclaude J., Lesceu S., Debey P., Doublet B., Tréguer E., Rezaei H., Knossow M. (2004) Insight into the PrPC-->PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prionscrapie-susceptibility variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 (28)**: 10254-9.
 - Eliot M., Adjou K., Couplier M., Fontaine JJ., Hamel R., Lilin T., Messiaen S., Andreoletti O., Baron T., Bencsik A., Biacabe AG., Beringue V., Laude H., Le Dur A., Villotte JL., Comoy E., Deslys JP., Grassi J., Simon S., Lantier F., Sarradin P. (2005) BSE agent signatures in goat. *Vet Rec* **156 (16)**: 523
 - Elsen JM., Aigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andreoletti O., Eychenner F., Khang JV., Poivey JP., Lantier F., Laplanche JL (1999) Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol* **144 (3)**: 431-445.

- Ersdal C., Ulvund M.J, Benestad SL., Tranulis MA. (2003) Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet Pathol* **40** (2): 164-74.
- Ersdal C., Ulvund MJ., Espenes A., Benestad SL., Sarradin P., Landsverk T. (2005) Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol* **42** (3): 258-74.
- Fediaevsky A., Tongue SC., Nöremark M., Calavas D., Ru G, Hopp P. (2008) A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res* **4**: 19.
- Felten SY., Felten DL. (1991) Innervation of Lymphoid Tissue. In *Psychoneuroimmunology, 2nd ed.; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA* 27–69.
- Felten SY., Felten DL., Bellinger DL., Olschowka JA. (1992) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. *Chem Immunol* **52**: 25-48.
- Fevrier B., Vilette D. Archer F., Loew D., Faigle W. Vidal M., Laude H., Raposo G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (26): 9683-8.
- Field EJ. (1969) A study of body, adrenal and pituitary weight changes in mouse scrapie with a note on neurosecretory activity. *Res Vet Sci* **10** (2): 151-5.
- Fischer M., Rulicke T., Raeber A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandner S., Aguzzi A., Weissmann C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15** (6): 1255-64.
- Foote WC., Clark GR., Maciulis A., Call JW., Hourrigan J., Evans RC., Marshall MR., de Camp M. (1993) Prevention of scrapie transmission in sheep using embryo transfer. *Am J Vet Res* **54** (11): 1863 – 8.
- Ford MJ., Burton LJ., Morris RJ., Hall SM. (2002) Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* **113** (1): 177-92.

- Forloni G., Bugiani O., Tagliavini F., Salmona M. (1996) Apoptosis-mediated neurotoxicity induced by beta-amyloid and PrP fragments. *Mol Chem Neuropathol* **28 (1-3)**: 163-71.
- Foster JD., McKelvey WA., Mylne MJ., William A, Hunter N., Hope J., Fraser H. (1992) Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet Rec* **130 (16)**: 341-3.
- Foster JD., Hope J., Fraser H. (1993) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep in goats. *Vet Rec* **133 (14)**: 339-41.
- Foster JD., McKelvey W, Fraser H., Chong A., Ross A., Parnham D., Goldmann W., Hunter N. (1999) Experimentally induced bovine spongiform encephalopathy did not transmit via goat embryos. *J Gen Virol* **80**: 517-24.
- Foster JD., Parnham D., Chong A., Goldmann W., Hunter N. (2001a) Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet Rec* **148 (6)**: 165-71.
- Foster JD., Parnham DW., Hunter N., Bruce M. (2001b) Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol* **82 (Pt 10)**: 2319-26.
- Foster JD., Goldmann W., McKenzie C., Smith A. Parnham DW., Hunter N. (2004) Maternal transmission studies of BSE in sheep. *J Gen Virol* **85 (Pt 10)**: 3159-63.
- Foster JD., Goldmann W., Hunter N. (2013) Evidence in sheep for pre-natal transmission of scrapie to lambs from infected mothers. *PLoS One*. **8(11)**: e79433.
- Fox KA., Jewell JE., Williams ES., Miller MW. (2006): Patterns of PrP^{CWD} accumulation during the course of chronic wasting disease infection in orally inoculated mule deer (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol* **87**: 3451–3461.
- Fraser H. and Dickinson, AG. (1968) The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* **78**: 301-311.
- Fraser H., Dickinson AG. (1973) Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* **83 (1)**: 29-40.

- Fraser H., Dickinson AG. (1978) Studies on the lymphoreticular system in the pathogenesis of scrapie: The role of spleen and thymus. *J Comp Pathol* **88**: 563–573.
- Fraser H., Brown K. (1994) Peripheral Pathogenesis of Scrapie in Normal and Immunocompromised Mice. *Anim. Technol* **45**: 21–22.
- Fraser H., Brown KL., Stewart K., McConnell I., McBride P., Williams A. (1996) Replication of scrapie in spleens of SCID mice follows reconstitution with wild-type mouse bone marrow. *J Gen Virol* **77 (Pt 8)**: 1935-40.
- Fuhrmann M., Mitteregger G., Kretzschmar H, Herms J. (2007) Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J Neurosci* **27 (23)**: 6224-33.
- Gadotti V.M., Bonfield SP., Zamponi GW. (2012) Depressive-like behavior of mice lacking cellular prion protein. *Behav Brain Res* **227 (2)**: 319-23.
- Garza MC., Fernández-Borges N., Bolea R., Badiola JJ., Castilla J., Monleón E. (2011) Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS One* **6 (12)**: e27525.
- Genovesi S., Leita L., Sequi P., Andrighetto I., Sorgato MC., Bertoli A. (2007) Direct detection of soil-bound prions. *PLoS One* **2 (10)**: e1069.
- Georgsson G., Sigurdarson S., Brown P. (2006) Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *J Gen Virol* **87 (Pt 12)**: 3737-40.
- Ghani AC., Ferguson NM., Donnelly CA., Anderson RM. (2000) Predicted vCJD mortality in Great Britain. *Nature* **406 (6796)**: 583-4.
- Gill ON., Spencer Y., Richard-Loendt A., Kelly C., Dabaghian R., Boyes L., Linehan J., Simmons M., Webb P., Bellerby P., Andrews N., Hilton DA., Ironside JW., Beck J., Poulter M., Mead S., Brandner S. (2013) Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ* **347**: f5675.
- Glatzel M. & Aguzzi A. (2000a) PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion. *J Gen Virol* **81 (Pt 11)**: 2813-21.

- Glatzel M & Aguzzi A. (2000b) Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect* **2 (6)**: 613-9.
- Glatzel M., Heppner FL., Albers KM., Aguzzi A. (2001) Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**: 25–34.
- Glatzel M., Abela E., Maissen M., Aguzzi A. (2003) Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **349 (19)**: 1812-20.
- Glaysher BR. & Mabbott NA. (2007) Role of the GALT in scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol* **178 (6)**: 3757-66.
- Goldmann W., Hunter N., Smith G., Foster J., Hope J. (1994) PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol* **75 (Pt 5)**: 989-95.
- Goldmann W., Martin T., Foster J., Hughes S., Smith G., Hughes K., Dawson M., Hunter N. (1996) Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapieincubation period. *J Gen Virol* **77 (Pt11)**: 2885-91.
- Goldmann W. (2008) PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res* **39**: 30.
- Gonzales-Romero D., Barria MA., Leon P., Morales R., Soto C. (2008) Detection of infectious prions in urine. *FEBS Letts* **582**: 3161-6.
- González L., Dagleish MP., Bellworthy SJ., Sisó S., Stack MJ., Chaplin MJ., Davis LA., Hawkins SA., Hughes .J, Jeffrey M. (2006) Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet Rec* **158 (10)**: 325-31.
- González L., Dagleish MP., Martin S., Dexter G., Steele P., Finlayson J., Jeffrey M. (2008a) Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet Rec* **162 (13)**: 397-403.
- González L., Horton R., Ramsay D., Toomik R., Leathers V., Tonelli Q., Dagleish MP., Jeffrey M., Terry L. (2008b) Adaptation and evaluation of a rapid test for

- the diagnosis of sheep scrapie in samples of rectal mucosa. *J Vet Diagn Invest* **20** (2): 203-8.
- González L., Jeffrey M., Dagleish MP., Goldmann W., Sisó S., Eaton SL., Martin S., Finlayson J, Stewart P., Steele P., Pang., Hamilton S., Reid HW., Chianini F. (2012) Susceptibility to scrapie and disease phenotype in sheep: cross-*PRNP* genotype experimental transmissions with natural sources. *Vet Res* **43** (1): 55.
 - Gordon WS. (1946) Advances in veterinary research: louping ill, tick-borne fever and scrapie. *Vet Rec* **58** (47): 516-25.
 - Gossert AD., Bonjour S., Lysec DA., Fiorito F., Wuthrich K (2005) Prion protein NMR structures of elk and mouse/elk hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 646-650.
 - Gough KC., Baker CA., Simmons HA., Hawkins SA., Maddison BC. (2015) Circulation of prions within dust on a scrapie affected farm. *Vet Res* **46**: 40.
 - Gough KC., Maddison BC. (2010) Prion transmission: Prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*: **4**: 275–82.
 - Gould SJ., Booth AM., Hildreth JE. (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (19): 10592-7.
 - Gousset K. & Zurzolo C. (2009) Tunnelling nanotubes: a highway for prion spreading? *Prion* **3** (2): 94-8.
 - Gregori L., Kovacs GG., Alexeeva I., Budka H., Rohwer RG. (2008) Excretion of transmissible spongiform encephalopathy infectivity in urine. *Emerg Infect Dis* **14**: 1406-12.
 - Grieg JR (1940). Scrapie, observations on the transmission of disease by mediate contact. *Vet J* **96**: 203-206.
 - Hadlow WJ., Race RE., Kennedy RC. (1987) Temporal distribution of transmissible mink encephalopathy virus in mink inoculated subcutaneously. *J Virol* **61** (10): 3235-40.
 - Hainfellner JA. & Budka H. (1999) Disease associated prion protein may deposit in

the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol* **98 (5)**: 458-60.

- Halliday S., Houston F., Hunter N. (2005) Expression of PrPC on cellular components of sheep blood. *J Gen Virol* **86 (Pt 5)**: 1571-9.
- Halliez S., Jaumain E., Huor A., Douet JY., Lugan S., Cassard H., Lacroux C., Béringue V., Andréoletti O., Vilette D. (2014) White blood cell-based detection of asymptomatic scrapie infection by ex vivo assays. *PLoS One* **9 (8)**: e104287.
- Hamir AN., Kunkle RA., Miller JM., Greenlee JJ., Richt JA. (2006): Experimental second passage of chronic wasting disease (CWD^{mule deer}) agent to cattle. *J Comp Pathol* **134**: 67–73.
- Hamir AN., Kunkle RA., Richt JA., Miller JM., Greenlee JJ. (2008) Experimental transmission of US scrapie agent by nasal, peritoneal, and conjunctival routes to genetically susceptible sheep. *Vet Pathol* **45 (1)**: 7-11.
- Han H., Bearss D., Browne W., Calaluce R., Nagle R., Hoff D. (2002) Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res* **62**: 2890–2896.
- Hasabe R., Raymond GJ., Horiuchi M., Caughey B. (2012) Reaction of complement factors varies with prion strains in vitro and in vivo. *Virology* **423 (2)**: 205-13.
- Haybaeck J., Heikenwalder M., Margalith I., Zellen N., Bridel C., Schwarz P., Merz K., Stiltz L., Aguzzi A. (2007) Intranasal and aerosolic prion transmission. *Precedings of the Neuroprion Network of Excellence 2007, Edimburgo*, **72**.
- Haybaeck J., Heikenwalder M., Klevenz B., Schwarz P., Margalith I., Bridel C., Mertz K., Zirdum E., Petsch B., Fuchs TJ., Stitz L., Aguzzi A. (2016) Correction: Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice. *PLoS Pathog* **12 (2)**: e1005463.
- Healy AM., Weavers E., McElroy M., Gomez-Parada M., Collins JD., O'Doherty E., Sweeney T., Doherty ML. (2003) The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med* **17 (6)**: 908-16.

- Heaton MP., Leymaster KA., Freking BA., Hawk DA., Smith TP., Keele JW., Snelling WM., Fox JM., Chitko-McKown CG., Laegreid WW. (2003): Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome* **14**: 65–777.
- Heesters BA., Chatterjee P., Kim YA., Gonzalez SF., Kuligowski MP., Kirchhausen T., Carroll MC. (2013) Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. *Immunity* **38 (6)**: 1164-75.
- Heesters BA., Myers RC., Carroll MC. (2014) Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* **14 (7)**: 495-504.
- Heggebø R., Press CM., Gunnes G., Lie KI., Tranulis MA., Ulvund M., Groschup MH., Landsverk T. (2000) Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol* **81 (Pt 9)**: 2327-37.
- Heggebø R., Press CM., Gunnes G., González L., Jeffrey M. (2002) Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol* **83 (Pt 2)**: 479-89.
- Heggebø R., González L., Press CM., Gunnes G., Espenes A, Jeffrey M. (2003a) Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol* **84 (Pt 5)**: 1327-38.
- Heggebø R., Press CM., Gunnes G., Ulvund MJ., Tranulis MA., Lsverk T. (2003b) Detection of PrPSc in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. *J Comp Pathol* **128 (2-3)**: 172-81.
- Heikenwalder M., Zeller N., Seeger H., Prinz M., Klöhn PC., Schwarz P., Ruddle NH., Weissmann C., Aguzzi A. (2005) Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. *Science* **307 (5712)**: 1107-10.

- Heitz S., Grant NJ., Leschiera R., Haeberli AM., Demais V., Bombarde G., Bailly Y. (2010) Autophagy and cell death of Purkinje cell overexpressing Doppel in Prnp-deficient mice. *Brain Pathol* **20** (1): 119-32.
- Heppner FL., Christ AD., Klein MA., Prinz M., Fried M., Kraehenbuhl JP., Aguzzi A. (2001) Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* **7** (9): 976-7.
- Herrmann LM., Baszler TV., Knowles DP. (2000) PrP(c) mRNA, but not PrP(Sc) is found in the salivary glands of scrapie-infected sheep. *Biochim Biophys Acta* **1479** (1-2): 147-54.
- Herrmann LM., Davis WC., Knowles DP., Wardrop KJ., Sy MS., Gambetti P., O'Rourke KI. (2001) Cellular prion protein is expressed on peripheral blood mononuclear cells but not platelets of normal and scrapie-infected sheep. *Haematologica* **86** (2): 146-53.
- Hetz C., Maundrell K., Soto C. (2003) Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med* **9** (6): 237-43.
- Hill AF., Desbruslais M., Joiner S., Sidle KC., Gowland I., Collinge J., Doey LJ., Lantos P., (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389** (6650): 448-50, 526.
- Hill AF., Joiner S., Beck .A., Campbell TA., Dickinson A., Poulter M., Wadsworth JD., Collinge, J. (2006) Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain* **129**: 676-685.
- Hilton D., Fathers E., Edwards P., Ironside J., Zajicek J. (1998) Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **352** (9129): 703–704.
- Hilton DA., Ghani AC., Conyers L., Edwards P., McCardle L., Ritchie D., Penney M., Hegazy D., Ironside JW. (2004) Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* **203** (3): 733-9.
- Hoffmann C., Eiden M., Kaatz M., Keller M., Ziegler U., Rogers R., Hills B., Balkema-Buschmann A., van Keulen L., Jacobs JG., Groschup MH. (2011) BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Vet Res* **42**: 21.

- Hollinshead WH. (1937) The innervation of abdominal chromaffin tissue. *Journal of Comparative Neurology* **67**: 133-143.
- Horiuchi M., Yamazaki N., Ikeda T., Ishiguro N., Shinagawa M. (1995) A cellular form of prion protein (PrP^c) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol* **76**: 2583-2587.
- Horiuchi M., Furuoka H., Kitamura N., Shinagawa M. (2006) A lymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route. *Jpn J Vet Res* **53 (3-4)**: 149-57.
- Hortells P., Monzòn M., Monleòn E., Acín C., Vargas A., Bolea R., Luján L., Badiola JJ. (2006) Pathological Findings in retina and visual pathways associated to natural Scrapie in sheep. *Brain Res* **1108 (1)**: 188-94.
- Hoshi T. (1926) Morphologisch-experimentelle Untersuchung über die Innervation der Nebenniere. *Mitteilung für allgemeine Pathologie Sendai* **3**: 328-342.
- Hosoi J., Murphy GF., Egan CL., Lerner EA., Grabbe S., Asahina A., Granstein RD. (1993) Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* **363 (6425)**: 159-63.
- Huang FP., Platt N., Wykes M., Major JR., Powell TJ., Jenkins CD., MacPherson GG. (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* **191 (3)**: 435-44.
- Huang H., Soutyrine A., Rendulich J., O'Rourke K., Balachandran A. (2011) Investigation of the effects of experimental autolysis on the detection of abnormal prion protein in lymphoid and central nervous system tissues from elk and sheep using the Western blotting method. *Can J Vet Res* **75 (1)**: 69-72.
- Huang FP., Farquhar CF., Mabbott NA., Bruce ME., MacPherson GG. (2002) Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol* **83 (Pt 1)**: 267-71.
- Houston F., Foster JD., Chong A., Hunter N., Bostock CJ. (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**: 999-1000.

- Houston F., Goldmann W., Chong A., Jeffrey M., González L., Foster J, Parnham D., Hunter N. (2003) Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* **423 (6939)**: 498.
- Houston F., McCutcheon S., Goldmann W., Chong A., Foster J., Sisó S, González L, Jeffrey M, Hunter N. (2008) Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* **112**: 4739–4745
- Houston F., Goldmann W., Foster J., González L., Jeffrey M., Hunter N. (2015) Comparative susceptibility of sheep of different origins, breeds and PRNP genotypes to challenge with bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *PLoS ONE* **10 (11)**: e0143251.
- Houston SA., Cerovic V., Thomson C., Brewer J., Mowat AM., Milling S. (2016) The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol* **9 (2)**: 468-78.
- Hunter N. & Houston F. (2002) Can prion diseases be transmitted between individuals via blood transfusion: evidence from sheep experiments. *Dev Biol (Basel)* **108**: 93-8.
- Hunter N., Foster JD., Smith G., Goldmann W., Stear MJ., Hope J., Bostock C. (1996) Natural scrapie is a closed flock of Cheviot sheep occurs in specific PrP genotypes. *Arch Virol* **141**: 809-824.
- Hunter N., Foster J., Chong A., McCutcheon S., Parnham D., Eaton S., MacKenzie C., Houston F. (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* **83 (Pt 11)**: 2897-905.
- Hwang D., Lee IY., Yoo H., Gehlenborg N. Cho JH., Petritis B., Baxter D., Pitstick R., Young R., Spicer D., Price ND., Hohmann JG., Dearmond SJ., Carlson GA., Hood LE. (2009) A systems approach to prion disease. *Mol Syst Biol* **5**: 252.
- Kaeser PS., Klein MA., Swarcz P., Aguzzi A. (2001) Efficient lymphoreticular prion propagation requires PrP(c) in stromal and hematopoietic cells. *J Virol* **75 (15)**: 7097- 106.
- Kane SJ., Farley TK., Gordon EO., Estep J., Bender HR., Moreno JA., Bartz J., Telling GC., Pickering MC., Zabel MD. (2017) Complement Regulatory

Protein Factor H Is a Soluble Prion Receptor That Potentiates Peripheral Prion Pathogenesis. *J Immunol* **199** (11): 3821-3827.

- Kapasi ZF., Burton GF., Shultz LD., Tew JG., Szakal AK. (1993) Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol* **150** (7): 2648-58.
- Kitamoto T., Muramoto T., Mohri S., Doh-Ura K., Tateishi J. (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* **65** (11): 6292-5.
- Klein MA., Frigg R., Flechsig E., Raeber AJ., Kalinke U., Bluethmann H., Bootz F., Suter M., Zinkernagel RM., Aguzzi A. (1997) A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* **390(6661)**: 687-90.
- Klein MA., Frigg R., Raeber AJ., Flechsig E., Hegyi I., Zinkernagel RM., Weissmann C., Aguzzi A. (1998) PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* **4** (12): 1429-33.
- Klein MA., Kaeser PS., Schwarz P., Weyd H., Xenarios I., Zinkernagel RM., Carroll MC., Verbeek JS., Botto M., Walport MJ., Molina H., Kalinke U., Acha-Orbea H., Aguzzi A. (2001) Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* **7** (4): 488-92.
- Krautler NJ, Kana V., Kranich J., Tian Y., Perera D., Lemm D., Schwarz P., Armulik A., Browning JL., Tallquist M., Buch T., Oliveira-Martins JB., Zhu C., Hermann M., Wagner U., Brink R., Heikenwalder M., Aguzzi A. (2012) Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* **150** (1): 194-206.
- Kujala P., Raymond CR., Romeijn M., Godsave SF., van Kasteren SI., Wille H., Prusiner SB., Mabbott NA., Peters PJ. (2011) Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* **7** (12): e1002449.
- Imran M., Mahamood S., (2011) An overview of animal prion diseases. *J Virol* **8**: 493.
- Jeffrey M., Halliday WG., Bell J., Johnston AR., MacLeod NK., Ingham C., Sayers AR., Brown DA., Fraser JR. (2000) Synapse loss associated with

abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26 (1)**: 41-54.

- Jeffrey M., Begara-McGorum I., Clark S., Martin S., Clark J., Chaplin M., González L. (2002) Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapiecases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol* **127 (4)**: 264-73.
- Jeffrey M. & Gonzalez L. (2007) Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33 (4)**: 373-94.
- Jeffrey M., González L., Simmons MM., Hunter N., Martin S., McGovern G. (2017) Altered trafficking of abnormal prion protein in atypical scrapie: prion protein accumulation in oligodendroglial inner mesaxons. *Neuropathol Appl Neurobiol* **43 (3)**: 215-226.
- Johnson C., Johnson J., Clayton M., McKenzie D., Aiken J. (2003): Prion protein gene heterogeneity in free-ranging white-tailed deer within the chronic wasting disease affected region of Wisconsin. *J Wildl Dis* **39**: 576-581.
- Johnson C., Johnson J., Vanderloo JP., Keane D., Aiken JM., McKenzie D. (2006a): Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *J Gen Virol* **87**: 2109–2114.
- Kahn S., Dubé C., Bates L., Balachandran A. (2004) Chronic Wasting Disease in Canada: *Part I. Canadian Veterinary Journal* **45**: 397-404.
- Kimberlin RH., Cole S., Walker Ca. (1987) Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* **68 (7)**: 1875-81.
- Kimberlin RH., Walker CA. (1989) Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. *Virus Res* **12**: 213–220.
- Kong Q., Huang S., Zou W., Vanegas D., Wang M., Wu D., Yuan J., Zheng M., Bai H., Deng H., Chen K., Jenny AL., O'Rourke K., Belay ED., Schongenberger LB., Petersen RB., Sy MS., Chen SG., Gambetti PL. (2005) Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J. Neurosci* **25**: 7944–7949

- Konold T., Davis A., Bone G., Bracegirdle J. Everitt S., Chaplin M. Saunders GC., Cawthraw S., Simmons MM. (2007) Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Vet Res* **3**: 2.
- Konold T., Bone G., Vidal-Diez A., Tortosa R., Davis A., Dexter G. Hill P. Jeffrey M., Simmons MM., Chaplin MJ., Bellworthy SJ., Berthelin-Baker C. (2008) Pruritus is a common feature in sheep infected with the BSE agent. *BMC Vet Res* **4**: 16.
- Konold T., Bone G., Ortiz Pelaez A., Tortosa R., Clifford D., Dexter G., Mathieson Simmons M., Spiropoulos J., Berthelin-Baker Cf. (2009) Associations of clinical signs and prion protein genotypes in british sheep with scrapie. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **Vol. 116 n.11**: 380-388.
- Konold T., Bone GE., Phelan LJ., Simmons MM., González L., Sisó S., Goldmann W., Cawthraw S., Hawkins SA. (2010). Monitoring of clinical signs in goats with transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Vet Res* **6**: 13.
- Konold T., Phelan L. (2014) Clinical examination protocol to detect atypical and classical scrapie in sheep. *J Vis Exp* **19 (83)**: e51101.
- Konold T., Hawkins SA., Thurston LC., Maddison BC., Gough KC., Duarte A., Simmons HA. (2015) Objects in contact with classical scrapie sheep act as a reservoir for scrapie transmission. *Front Vet Sci* **2**: 32.
- Kujala P., Raymond CR., Romeijn M., Godsave SF., van Kasteren SI., Wille H., Prusiner SB., Mabbott NA., Peters PJ. (2011) Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* **7 (12)**: e1002449.
- Konold T., Moore SJ., Bellworthy SJ., Simmons HA. (2008) Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res* **4**: 14.
- Kuncheva LI., del Rio Vilas VJ, Rodríguez JJ. (2007) Diagnosing scrapie in sheep: a classification experiment. *Comput Biol Med* **37 (8)**: 1194-202.

- Kuwahara C., Takeuchi A., Nishimura T., Haraguch, K., Kubosaki A., Matsumoto Y., Saeki K., Matsumoto Y., Yokoyama T., Itohara S., Takashi O. (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400 (6741)**: 225–6.
- Lacroux C., Corbière F., Tabouret G., Lugan S., Costes P., Mathey J., Delmas JM., Weisbecker JL., Foucras G., Cassard H., Elsen JM., Schelcher F., Andréoletti O. (2007) Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep. *J Gen Virol* **88 (Pt 3)**: 1056-61.
- Lacroux C., Simon S., Benestad SL., Maillet S., Mathey J., Lugan S., Corbière F., Cassard H., Costes P., Bergonier D., Weisbecker JL., Moldal T., Simmons H., Lantier F., Feraudet-Tarisse C., Morel N., Schelcher F., Grassi J., Andréoletti O. (2008) Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog* **4 (12)**: e1000238.
- Lacroux C., Vilette D., Fernández-Borges N., Litaise C., Lugan S., Morel N., Corbière F., Simon S., Simmons H., Costes P., Weisbecker JL., Lantier I., Lantier F., Schelcher F., Grassi J., Castilla J., Andréoletti O. (2012) Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *J Virol* **86 (4)**: 2056-66.
- Laegreid WW., Clawson ML., Heaton M.P, Green BT., O'Rourke KI., Knowles DP.(2008) Scrapie resistance in ARQ sheep. *J Virol* **82 (20)**:10318-20.
- Landini F. & Di Guardo G. (2013) Chronic Wasting Disease dei cervidi: sorveglianza sanitaria, analisi del rischio e ricadute ispettive. *Argomenti SI.Ve.M.P.* **3**: 44-79.
- Langevin C., Gousset K., Costanzo M., Richard-Le Goff O., Zurzolo C. (2010) Characterization of the role of dendritic cells in prion transfer to primary neurons. *Biochem J* **431 (2)**: 189-98.
- Laroche-Pierre S., Jodoin J., LeBlanc AC. (2009) Helix 3 is necessary and sufficient for prion protein's anti-Bax function. *J Neurochem* **108**: 1019-1031.
- Le Dur A., Béringue V., Andréoletti O., Reine F., Laï TL., Baron T., Bratberg B., Vilotte JL., Sarradin P., Benestad SL., Laude H. (2005) A newly identified type of scrapie

- agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102 (44)**: 16031-6.
- Lee JA. (2009) Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. *BMB Rep* **42 (6)**: 324-30.
 - Legname G., Baskakov IV., Nguyen HO., Riesner D., Cohen FE., DeArmond SJ., Prusiner SB. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* **305 (5684)**: 673-6.
 - Leita L. (2006) Interaction of prion proteins with soil. *Soil Biology and Biochemistry Volume* **38**: 1638-1644.
 - Lewis PR. & Shute CC. (1969) An electron-microscopic study of cholinesterase distribution in the rat adrenal medulla. *J Microsc* **89 (2)**: 181-93.
 - Liang J., Pan YL., Ning XX., Sun LJ., Lan M., Hong L., Du JP., Liu N., Liu CJ., Qiao TD., Fan DM. (2006) Overexpression of PrPC and its antiapoptosis function in gastric cancer. *Tumour Biol* **27 (2)**: 84-91.
 - Liang J., Pan Y., Zhang D., Guo C., Shi Y., Wang J., Chen Y., Wang X., Liu J., Guo X., Chen Z., Qiao T., Fan D. (2007) Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. *FASEB J* **21 (9)**: 2247-56.
 - Liberski PP & Ironside JW. (2004) An outline of the neuropathology of transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases). *Folia Neuropathol* **42 (Suppl B)**: 39-58.
 - Liberski PP., Brown DR., Sikorska B., Caughey B., Brown P. (2008) Cell death and autophagy in prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies). *Folia Neuropathol* **46 (1)**: 1-25.
 - Ligios C., Dexter G., Spiropoulos J., Maestrale C., Carta A., Simmons MM. (2004) Distribution of vascular amyloid in scrapie-affected sheep with different genotypes. *J Comp Pathol* **131 (4)**: 271-6.
 - Ligios C., Sigurdson CJ., Santucci C., Carcassola G., Manco G., Basagni M., Maestrale C., Cancedda MG., Madau L., Aguzzi A. (2005) PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med* **11 (11)**: 1137-8.

- Ligios C., Cancedda MG., Madau L., Santucciu C., Maestrale C., Agrimi U., Ru G., Di Guardo G. (2006) PrP(Sc) deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie. *Arch Virol* **151 (10)**: 2007-20.
- Ligios C., Cancedda GM., Margalith I., Santucciu C., Madau L., Maestrale C., Basagni M., Saba M., Heikenwalder M. (2007) Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS One* **2 (9)**: e859.
- Ligios C., Cancedda MG., Carta A., Santucciu C., Maestrale C., Demontis F., Saba M., Patta C., DeMartini JC., Aguzzi A., Sigurdson CJ. (2011) Sheep with scrapie and mastitis transmit infectious prions through the milk. *J Virol* **85 (2)**: 1136-9.
- Llewelyn CA., Hewitt PE., Knight RS., Amar K., Cousens S, Mackenzie J., Will RG. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363(9407)**: 417-21.
- Lyahyai J., Bolea R., Serrano C., Vidal E., Pumarola M., Badiola JJ, Zaragoza P., Martín-Burriel I. (2007) Differential expression and protein distribution of Bax in natural scrapie. *Brain Res* **1180**: 111-20.
- Mabbott NA., Williams A., Farquhar CF., Pasparakis M., Kollias G., Bruce ME. (2000a) Tumor necrosis factor alpha-deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie. *J Virol* **74 (7)**: 3338-44.
- Mabbott NA., Mackay F., Minns F., Bruce ME. (2000b) Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat Med* **6 (7)**: 719-20.
- Mabbott NA. & Bruce ME. (2001) The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol* **82 (Pt 10)**: 2307-18.
- Mabbott NA, Bruce ME., Botto M., Walport MJ., Pepys MB. (2001) Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med* **7 (4)**: 485-7.

- Mabbott NA., Young J., McConnell I., Bruce ME. (2003) Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol* **77** (12): 6845-54.
- Mabbott NA. (2004) The complement system in prion diseases. *Curr Opin Immunol* **16** (5): 587-93.
- Mabbott NA. & MacPherson GG. (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* **4** (3): 201-1.
- Mabbott NA., Kenneth Baillie J., Kobayashi A., Donaldson DS., Ohmori H., Yoon SO., Freedman AS., Freeman TC., Summers KM. (2011) Expression of mesenchyme-specific gene signatures by follicular dendritic cells: insights from the meta-analysis of microarray data from multiple mouse cell populations. *Immunology* **133** (4): 482-98.
- Mabbott NA., Donaldson DS., Ohno H., Williams IR., Mahajan A. (2013) Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* **6** (4): 666-77.
- Mabbott NA. (2017) How do PrP^{Sc} Prions Spread between Host Species, and within Hosts? *Pathogens* **6** (4): 60.
- Maddison BC., Baker CA., Rees HC., Terry LA., Thorne L., Bellworthy SJ., Whitlam GC., Gough KC. (2009) Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J Virol* **83** (16): 8293-6.
- Maddison BC., Baker CA., Terry LA., Bellworthy SJ., Thorne L., Rees HC., Gough KC. (2010a) Environmental sources of scrapie prions. *J Virol* **84** (21): 11560-2.
- Maddison BC., Rees HC., Baker CA., Taema M., Bellworthy SJ., Thorne L., Terry LA., Gough KC. (2010b) Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J Infect Dis* **201** (11): 1672-6.
- Maestrale C., Carta A., Attene S., Galistu A., Santucci C., Cancedda MG., Saba M., Sechi S., Patta C., Bandino E., Ligios C. (2009) p.Asn176Lys and p.Met137Thr dimorphisms of the PRNP gene significantly decrease the susceptibility to classical scrapie in ARQ/ARQ sheep. *Anim Genet* **40** (6): 982-5.

- Maestrone C., Di Guardo G., Cancedda MG., Marruchella G., Masia M., Sechi S., Macciocu S., Santucci C., Petrucci M., Ligios C. (2013) A lympho-follicular microenvironment is required for pathological prion protein deposition in chronically inflamed tissues from scrapie-affected sheep. *PLoS One* **8** (5): e62830.
- Maglio LE., Perez MF., Martins VR., Brentani RR., Ramirez OA. (2004) Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* **131** (1-2): 58-64
- Mahal SP., Baker CA., Demczyk CA., Smith EW., Julius C., Weissmann C. (2008) Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 20908-20913.
- Maignien T., Shakweh M., Calvo P., Marcé D., Salès N., Fattal E., Deslys JP., Couvreur P., Lasmezas CI. (2005) Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm* **298** (2): 293-304.
- Mallucci GR., Ratté S., Asante EA., Linehan J., Gowland I., Jefferys JG, Collinge J. (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* **21** (3): 202-10.
- Mallucci GR. (2009) Prion neurodegeneration: starts and stops at the synapse. *Prion* **3** (4): 195-201.
- Manuelidis L., (2007) A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem* **100**:897-915.
- Manuelidis L., (2010) Transmissible encephalopathy agents: virulence, geography and clock work. *Virulence* **1** (2): 101-4.
- Manuelidis L., Yu ZX., Barquero N., Mullins B., (2007) Cell infected with scrapie and Creutzfeldt-jakob disease agents produce intracellular 25 nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 1965-1970.
- Marcato P.S., Di Guardo G., (2008) Patologia sistematica veterinaria. Edagricole, Milano, 1302-1309
- Marruchella G., Ligios C., Albanese V., Cancedda MG., Madau L., Lalatta-Costerbosa G., Mazzoni M., Clavanzani P., Chiochetti R., Sarli G., De Grossi L., Agrimi U., Aguzzi A., Di Guardo G. (2007) Enteroglia and neuronal involvement without apparent neuron loss in ileal enteri

- cnervous system plexuses from scrapie-affected sheep. *J Gen Virol* **88 (Pt 10)**: 2899-904.
- Marruchella G., Ligios C., Baffoni M., Cancedda MG., Demontis F., Donatucci G., Chiocchetti R., Clavenzani P., Lalatta-Costerbosa G., Di Guardo G. (2009) Ileal tract and Peyer's patch innervation in scrapie-free versus scrapie-affected ovines. *Arch Virol* **154 (4)**: 709-14.
 - Marruchella G., Ligios C., Di Guardo G. (2012) Age, scrapie status, PrP genotype and follicular dendritic cells in ovine ileal Peyer's patches. *Res Vet Sci* **93 (2)**: 853-6.
 - Martinez D., Lopez-Bravo M., Metharom P., Ardavin C., Aucouturier P., (2006) Prion protein expression by mouse dendritic cells is restricted to the nonplasmacytoid subsets and correlates with the maturation state. *J Immunol* **177 (9)**: 6137-42.
 - Masters CL. & Richardson EP Jr. (1978) Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. *Brain* **101 (2)**: 333-44.
 - Mathiason CK., Powers JG., Dahmes SJ., Osborn DA., Miller KV., Warren RJ., Mason GL., Hays SA., Hayes-Klug J., Seelig DM., Wild MA., Wolfe LL., Spraker TR., Miller MW., Sigurdson CJ., Telling GC., Hoover EA. (2006) Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* **314 (5796)**: 133-6.
 - Mathiason CK., Hayes-Klug J., Hays SA, Powers J., Osborn DA., Dahmes SJ., Miller KV., Warren RJ., Mason GL., Telling GC, Young AJ., Hoover EA., (2010) B cells and platelets harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. *J Virol* **84 (10)**: 5097-107.
 - Mattei V., Garofalo T., Misasi R., Circella A., Manganelli V., Lucania G., Pavan A., Sorice M. (2004) Prion protein is a component of the multimolecular signalling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett* **560 (1-3)**: 14-8.
 - Mazza M., Iulini B., Vaccari G., Acutis P., Martucci F., Esposito E., Paletto S., Barocci S., Chiappini B., Corona C., Barbieri I., Caramelli M., Agrimi U.,

- Casalone C., Nonno R. (2010) Co-existence of classical scrapie and Nor98 in a sheep from an Italian outbreak. *Res Vet Sci* **88**: 478-485.
- McBride PA. & Beekes M. (1999) Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett* **265**: 135–138.
 - McBride PA. & Beekes M. (2000) Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* **278**: 181–184.
 - McBride PA., Schulz-Schaeffer WJ., Donaldson M., Bruce M., Diringer H., Kretzschmar HA., Beekes M. (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* **75** (19): 9320-7.
 - McCulloch L., Brown KL., Bradford BM., Hopkins J., Bailey M., Rajewsky K., Manson JC., Mabbott NA. (2011) Follicular dendritic cell-specific prion protein (PrP) expression alone is sufficient to sustain prion infection in the spleen. *PLoS Pathog* **7** (12): e1002402.
 - McCulloch L., Brown KL., Mabbott NA. (2013) Ablation of the cellular prion protein, PrPC, specifically on follicular dendritic cells has no effect on their maturation or function. *Immunology* **138** (3): 246-57.
 - McCutcheon S., Alejo Blanco AR., Houston EF., de Wolf C., Tan BC., Smith A., Groschup MH., Hunter N., Hornsey VS., MacGregor IR., Prowse CV., Turner M., Manson JC. (2011) All clinically-relevant blood components transmit prion disease following a single blood transfusion: a sheep model of vCJD. *PLoS One* **6** (8): e23169.
 - McFarlin DE., Raff MC., Simpson E., Nehlsen SH. (1971) Scrapie in immunologically deficient mice. *Nature* **233** (5318): 336.
 - McGovern G., Brown KL., Bruce ME., Jeffrey M. (2004) Murine scrapie infection causes an abnormal germinal centre reaction in the spleen. *J Comp Pathol* **130** (2-3): 181-94.
 - McGovern G., Jeffrey M. (2007) Scrapie-specific pathology of sheep lymphoid tissues. *PLoS One* **2** (12): e1304.

- McGovern G., Mabbott N., Jeffrey M. (2009) Scrapie affects the maturation cycle and immune complex trapping by follicular dendritic cells in mice. *PLoS One* **4** (12): e8186.
- Michel B., Ferguson A., Johnson T., Bender H., Meyerett-Reid C., Pulford B., von Teichman A., Seelig D., Weis JH., Telling GC., Aguzzi A., Zabel MD. (2012) Genetic depletion of complement receptors CD21/35 prevents terminal prion disease in a mouse model of chronic wasting disease. *J Immunol* **189** (9): 4520-7.
- Michel B., Ferguson A., Johnson T., Bender H., Meyerett-Reid C., Wyckoff AC., Pulford B., Telling GC., Zabel MD. (2013) Complement protein C3 exacerbates prion disease in a mouse model of chronic wasting disease. *Int Immunol* **25** (12): 697-702.
- Miller MW., Williams ES. (2002) Detecting PrP (CWD) in mule deer by immunohistochemistry of lymphoid tissues. *Vet. Rec.* **151** (20): 610-612.
- Miller MW., Williams ES. (2003) Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* **425** (6953): 35-36
- Mishra RS., Basu S., Gu Y., Luo X., Zou WQ., Mishra R., Li R., Chen SG., Gambetti P., Fujioka H., Singh N. (2004) Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci* **24** (50): 11280-90.
- Mitchell DA., Kirby L., Paulin SM., Villiers CL., Sim RB. (2007) Prion protein activates and fixes complement directly via the classical pathway: implications for the mechanism of scrapie agent propagation in lymphoid tissue. *Mol Immunol* **44** (11): 2997-3004.
- Miyazawa K., Kanaya T., Takakura I., Tanaka S., Hondo T., Watanabe H., Rose MT., Kitazawa H., Yamaguchi T., Katamine S., Nishida N., Aso H. (2010) Transcytosis of murine-adapted bovine spongiform encephalopathy agents in an in vitro bovine M cell model. *J Virol* **84** (23): 12285-91.

- Mohan J., Bruce ME., Mabbott NA. (2005) Follicular dendritic cell dedifferentiation reduces scrapie susceptibility following inoculation via the skin. *Immunology* **114** (2): 225-34.
- Mok SW., Proia RL., Brinkmann V., Mabbott NA. (2012) B cell-specific S1PR1 deficiency blocks prion dissemination between secondary lymphoid organs. *J Immunol* **188** (10): 5032-40.
- Monesi V. (2012) Istologia. 6° edizione, p 485- 488. Piccin Editore, Padova.
- Montrasio F., Cozzio A., Flechsig E., Rossi D., Klein MA., Rüllicke T., Raeber AJ., Vosshenrich CA., Proft J., Aguzzi A., Weissmann C. (2001) B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (7): 4034-7.
- Moore RC., Hope J., McBride PA., McConnell I., Selfridge J., Melton DW., Manson JC. (1998) Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet* **8** (2): 118-25.
- Moreau K., Luo S., Rubinsztein DC. (2010) Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **22** (2): 206-11.
- Morelli A., Biagetti M., Scoccia E., Maresca C. (2012) Breve excursus sulla scrapie: la malattia - A short excursus on scrapie: The disease. *Sanità Pubblica Veterinaria*, n. **75**, Dicembre, <http://indice.spvet.it#564>
- Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier JL., Lehmann S., Launay JM., Kellermann O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Scienze* **289** (5486): 1925-8.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. (2005) Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol* **86**: 231–5.
- Murayama Y., Yoshioka M., Okada H., Takata M., Yokoyama T., Mohri S. (2007) Urinary excretion and blood levels of prions in scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* **88**: 2890-8.
- Myagkaya G & Schellens JP. (1981) Final stages of erythrophagocytosis in the sheep placenta. *Cell Tissue Res.* **214**: 501–518.

- Nentwig A., Oevermann A., Heim D., Botteron C., Zellweger K, Drögemüller C., Zurbriggen A., Seuberlich T. (2007) Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog* **3(6)**: e82.
- Nonno R., Di Bari MA., Cardone F., Vaccari G., Fazzi P., Dell'Omo G., Cartoni C., Ingrosso L., Boyle A., Galeno R., Sbriccioli M., Lipp HP., Bruce M., Pollichiari M. (2006) Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt-Jakob disease strains in bank voles. *PLoS Pathog* **2**: e12.
- Nonno R., Esposito E., Vaccari G., conte M., Marcon S., Di Bari MA., Ligios C., Di Guardo G., Agrimi U. (2003) Molecular analysis of cases of Italian sheep scrapie and comparasion with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. *J Clin Microbiol* **41 (9)**: 4127-33.
- Nuvolone M., Kana V., Hutter G., Sakata D, Mortin-Toth SM., Russo G., Danska JS., Aguzzi A. (2013) SIRPalpha polymorphisms, but not the prion protein, control phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* **210**: 2539-2552.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**: 735-746.
- Onodera T., Ikeda T., Muramatsu Y., Shinagawa M. (1993) Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan. *Microbiol Immunol* **37**: 311–31.
- Oomori Y., Okuno S., Fujisawa H., Ono K. (1991) Immunoelectron microscopic study of tyrosine hydroxylase immunoreactivenerve fibers and ganglion cells in the rat adrenal gland. *Anat Rec* **229 (3)**: 407-14.
- Orge L., Galo A., Machado C., Lima C., Ochoa C., Silva J., Ramos M., Simas JP. (2004) Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol* **85 (Pt 11)**: 3487-91.
- O'Rourke KI., Besser TE., Miller MW., Cline TF., Spraker TR., Jenny AL., Wild MA., Zebarth GL., Williams ES. (1999): PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol* **80**: 2765–2769.

- O'Rourke KI., Baszler TV., Besser TE., Miller JM., Cutlip RC., Wells GA., Ryder SJ., Parish SM., Hamir AN., Cockett NE., Jenny A., Knowles DP. (2000) Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* **38** (9): 3254-9.
- O'Rourke KI., Spraker TR., Hamburg LK., Besser TE., Brayton KA., Knowles DP. (2004): Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Gen Virol* **85**: 1339–1346.
- O'Rourke KI., Spraker TR., Zhuang D., Greenlee JJ., Gidlewski TE., Hamir AN. (2007): Elk with a long incubation prion disease phenotype have a unique PrP^d profile. *Cell Mol Dev Neurosc* **18**: 1935–1938.
- O'Rourke KI., Zhuang D., Truscott TC., Yan H., Schneider DA. (2011) Sparse PrP(Sc) accumulation in the placentas of goats with naturally acquired scrapie. *BMC Vet Res* **7**: 7.
- Papisavva-Stylianou P., Windl O., Saunders G., Mavrikiou P., Toumazos P., Kakoyiannis C. (2011) PrP gene polymorphisms in Cyprus goats and their association with resistance or susceptibility to natural scrapie. *Vet J* **187**: 245–50.
- Parchi P., Castellani R., Capellari S., Ghetti B., Young K., Chen SG., Farlow M., Dickson DW., Sima AA., Trojanowski JQ., *et al.* (1996) Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **39**: 767-778.
- Parker TL., Mohamed AA., Coupland RE. (1990b) The innervation of the adrenal gland. IV. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. *J Anat* **172**: 17-24.
- Parry HB (1960) Scrapie: A transmissible hereditary disease of sheep. *Nature* **185** (4711): 441-3.
- Pattison IH, Jones KM. (1991) The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec* **80** (1): 2-9.
- Pattison IH. & Millson GC. (1960) Further observation on the experimental production of scrapie in goats and sheep. *J Comp Pathol* **71**: 182-193.

- Pattison IH. & Millson GC. (1961) Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol* **71**: 101-109.
- Pattison IH., Hoare MN., Jebbet JN., Watson WA. (1972) Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie affected-sheep. *Vet Rec* **90**: 465-468.
- Pattison IH., Hoare MN., Jebbett JN., Watson WA (1974) Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br Vet J* **130 (4)**: 65-67.
- Peden AH., Head MW., Ritchie DL., Bell JE., Ironside JW. (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364 (9433)**: 527-9.
- Peretz D., Scott M.R., Groth D., Williamson R.A., Burton DR., Cohen FE., Prusiner SB. (2001) Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. *Protein Sci* **10**: 854-863.
- Peretz D., Williamson R.A., Legname G., Matsunaga Y., Vergara J., Burton DR., De Armond SJ., Prusiner SB., Scott MR. (2002) A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* **34**: 921-932.
- Peters C., Espinoza MP., Gallegos S., Opazo C., Aguayo LG. (2015) Alzheimer's Aβeta interacts with cellular prion protein inducing neuronal membrane damage and synaptotoxicity. *Neurobiol Aging* **36 (3)**: 1369-77.
- Pirisinu L., Migliore S., Di Bari MA., Esposito E., Baron T., D'Agostino C., De Grossi L., Vaccari G., Agrimi U., Nonno R. (2011) Molecular discrimination of sheep bovine spongiform encephalopathy from scrapie. *Emerg Infect Dis* **17**: 695-698.
- Pocchiari M., (1994) Prions and related neurological disease. *Med Aspects Med* **15**: 195-291.
- Polak MP., Larska M., Langeveld JP., Buschmann A., Groschup MH., Zmudzinski JF. (2010) Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Vet J* **186 (1)**: 47-52.
- Poli G., Cocilovo A., Dell'Arma P., Martino PA., Ponti W. (2005) Microbiologia e immunologia veterinaria. *UTET Scienze Mediche*.

- Prcina M., Kontsekova E., Novak M. (2015) Prion protein prevents heavy metals overloading of cells and thus protects them against their toxicity. *Acta Virol* **59** (2): 179-84.
- Prinz M., Montrasio F., Klein MA., Schwarz P., Priller J., Odermatt B., Pfeffer K., Aguzzi A. (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (2): 919-24.
- Prinz M., Huber G., Macpherson AJ., Heppner FL., Glatzel M., Eugster HP., Wagner N., Aguzzi A. (2003) Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol* **162** (4): 1103-11.
- Prusiner SB., (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13363-13383.
- Prusiner SB., (1998) The prion disease. *Brain Pathol* **8** (3): 499-513.
- Prusiner SB., (2001) Shattuck lecture neurodegenerative diseases and prions. *N. Engl. J. Med* **344**:1516-1526.
- Prusiner SB., Scott M., Foster D., Pan KM., Groth D., Mirenda C., Torchia M., Yang SL., Serban D., Carson GA. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoform in scrapie prion replication. *Cell* **63**: 673-678.
- Prusiner SB. (2013) Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet* **47**: 601-23.
- Qin K., Zhao L., Ash R., McDonough W., Zhao R. (2009) ATM mediated transcriptional elevation of prion in response to copperinduced oxidative stress. *J. Biol. Chem* **284**: 4582–4593.
- Race R., Jenny A., Sutton D.(1998) Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis* **178** (4): 949-53.
- Race B., Jeffrey M., McGovern G, Dorward D., Chesebro B. (2017) Ultrastructure and pathology of prion protein amyloid accumulation and cellular damage in extraneural tissues of scrapie-infected transgenic mice expressing anchorless prion protein. *Prion* **11** (4): 234-248.

- Race B., Meade-White K., Race R., Chesebro B. (2009a) Prion infectivity in fat of deer with chronic wasting disease. *J. Virol.* **83**: 9608–9610.
- Raeber AJ., Sailer A., Hegyi I., Klein MA., Rüllicke T., Fischer M., Brandner S., Aguzzi A., Weissmann C. (1999) Ectopic expression of prion protein (PrP) in T lymphocytes or hepatocytes of PrP knockout mice is insufficient to sustain prion replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96 (7)**: 3987-92.
- Rescigno M., Rotta G., Valzasina B., Ricciardi-Castagnoli P. (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* **204 (5)**: 572-81.
- Revault M., Quiquampoix H., Baron MH., Noinville S. (2005) Fate of prions in soil: trapped conformation of full-length ovine prion protein induced by adsorption on clays. *Biochim Biophys Acta* **1724 (3)**: 367-74.
- Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R., Wuthrich K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231). *Nature* **382**: 180-182.
- Roberts G & Clinton (1992) Prion disease: the spectrum of pathology and diagnostic considerations. In Prusiner SB., Collinge J., Powell J., Anderton B. “Prion disease of Humans and Animals”, *Ellis Horwood.UK, First edition Ed.* 215-240.
- Rocchi MS., Anderson MJ., Eaton S.L, Hamilton S., Finlayson J., Steele P., Barclay GR., Chianini F. (2007) Three-colour flow cytometric detection of PrP in ovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **116 (3-4)**: 172-81.
- Rossi D., Cozzio A., Flechsig E., Klein Ma., Rolicke T., Aguzzi A., Weissmann C. (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated With Dpl level in brain. *EMBO J* **20**: 694-702.
- Roucou X., Gains M., LeBlanc A.(2004) Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res* **75 (2)**: 153–61.

- Roucou X., Guo Q., Zhang Y., Goodyer CG., LeBlanc AC.(2003) Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* **278**:40877–40881.
- Russelakis-Carneiro M., Hetz C., Maundrell K, Soto C. (2004) Prion replication alters the distribution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts. *Am J Pathol* **165** (5): 1839-48.
- Ryder SJ., Dexter GE., Heasman L., Warner R., Moore SJ. (2009) Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res* **5**: 9.
- Ryou C., (2007) Prions and prions diseases: fundamentals and mechanistic details. *J Microbiol Biotechnol* **17** (7): 1059-70.
- Sadler TW. (2016) Embriologia medica di Langman. 5° edizione, Elsevier Srl.
- Safar JG., Lessard P., Tamgüney G., Freyman Y., Deering C., Letessier F., Dearmond SJ., Prusiner SB. (2008) transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis* **198** (1): 81-9.
- Safar JG., Kellings K., Serban A., Groth D., Cleaver .E., Prusiner SB., Riesner D. (2005b) Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* **79**: 10796-10806.
- Sakaguchi S., Katamine S., Nischida N., Moriuchi R., Shigematsu K., Sugimoto T., Nakatani A., Kataoka Y., Houtani T., Shirabe S., Okada K., Hasegawa S., Miyamoto T., Noda T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380** (6574): 528-31.
- Sakaguchi S (2008) Antagonist role of the N-terminal domain of prion protein to doppel. *Prion* **2** (3): 107-11.
- Salazar E., Monleón E., Bolea R., Acín C., Pérez M., Alvarez N., Leginagoikoa I., Juste R., Minguijón E., Reina R., Glaria I., Berriatua E., de Andrés D., Badiola JJ., Amorena B. Luján L. (2010) Detection of PrPSc in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Vet Res* **41** (5): 58.
- Sandberg MK., Al-Doujaily H., Sigurdson CJ., Glatzel M., O'Malley C., Powell C., Asante EA., Linehan JM., Brandner S., Wadsworth JDF., Collinge J. (2010)

- Chronic wasting disease prions are not transmissible to transgenic mice overexpressing human prion protein. *Journal of General Virology* **91**: 2651-2657
- Santos RL., Barreto-Filho JB., Marques AP., Andrade JS. (1996) Erythrophagocytosis in the caprine trophoblast. *Theriogenology* **46**: 1077–1083.
 - Santucci C., Maestrale C., Madau .L, Attene S., Cancedda MG., Demontis F., Tilocca MG., Saba M., Macciocu S., Carta A., Ligios C. (2010) Association of N176K and L141F dimorphisms of the PRNP gene with lack of pathological prion protein deposition in placentas of naturally and experimentally scrapie-affected ARQ/ARQ sheep. *J Gen Virol* **91 (Pt 9)**: 2402-7.
 - Saunders GC., Lantier I., Cawthraw S., Berthon P., Moore SJ., Arnold ME., Windl O., Simmons MM., Andréoletti O., Bellworthy S., Lantier F. (2009) Protective effect of the T112 PrP variant in sheep challenged with bovine spongiformencephalopathy . *J Gen Virol* **90 (Pt 10)**: 2569-74.
 - Schatzl HM., Wopfner F., Gilch S., von Brunn A., Jager G. (1997): Is codon 129 of prion protein polymorphic in human beings but not in animals? *Lancet* **349**: 1603–1604.
 - Schreuder BE. & Straub OC. (1996) BSE: a European problem. *Vet Rec* **138 (23)**: 575.
 - Schreuder BE., van Keulen LJ., Vromans ME., Langeveld JP., Smits MA. (1996) Preclinical test for prion diseases. *Nature* **381 (6583)**: 563.
 - Shmakov AN., McLennan NF., McBride P., Farquhar CF., Bode J., Rennison KA., Ghosh S. (2000) Cellular prion protein is expressed in the human enteric nervous system. *Nat Med* **6 (8)**: 840-1.
 - Schmidt TH., Bannard O., Gray EE., Cyster JG. (2013) CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches. *J Exp Med* **210 (6)**: 1099-107.
 - Schneider DA., Yan H., Fry LM., Alverson J., White SN., O'Rourke KI. (2008) Myenteric neurons of the ileum that express somatostatine are a target of prion neuroinvasion in a alimentary model of sheep scrapie. *Acta Neuropathol* **11**: 651-661.

- Scott JR., Fraser H. (1984) Degenerative hippocampal pathology in mice infected with scrapie. *Acta Neuropathol* **65 (1)**: 62-8.
- Scott MR., Foster D., Mirenda C., Serban D., Coufal F., Walchli M., Torchia M., Groth D., Carison G., De Armond SJ., Westaway D., Prusiner SB. (1989) Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59 (5)**: 847-57.
- Scott MR., Will R., Ironside J., Nguyen HO., Tremblay P., DeArmond SJ., Prusiner SB. (1999) Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96 (26)**: 15137-15142.
- Seeger H., Heikenwalder M., Zeller N., Kranich J., Schwarz P., Gaspert A., Seifert B., Miele G., Aguzzi A. (2005) Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science* **310 (5746)**: 324-6.
- Selkoe DJ. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298 (5594)**: 789-91.
- Seidel B., Thomzig A., Buschmann A., Groschup MH., Peters R., Beekes M., Terytze K. (2007) Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PLoS One* **2 (5)**: e435.
- Shlomchik MJ., Radebold K., Duclos N., Manuelidis L. (2001) Neuroinvasion by a Creutzfeldt-Jakob disease agent in the absence of B cells and follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98 (16)**: 9289-94.
- Shortman K., Liu YJ. (2001) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2 (3)**: 151-61.
- Sim RB., Kishore U., Villiers CL., Marche PN., Mitchell DA. (2007) C1q binding and complement activation by prions and amyloids. *Immunobiology* **212 (4-5)**: 355-62.
- Sigurdson CJ., Spraker TR., Miller MW., Oesch B., Hoover EA. (2001) PrP(CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *J Gen Virol* **82 (Pt 10)**: 2327-34.

- Sigurdson CJ., Barillas-Mury C., Miller MW., Oesch B., van Keulen LJ., Langeveld JP., Hoover EA. (2002) PrP(CWD) lymphoid cell targets in early and advanced chronic wasting disease of mule deer. *J Gen Virol* **83 (Pt 10)**: 2617-28.
- Sigurdson CJ., Nilsson KP., Hornemann S., Manco G., Polymenidou M., Schwarz P., Leclerc M., Hammarstrom P., Wuthrich K., Aguzzi A. (2007) Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers. *Nat Methods* **4**: 1023-1030.
- Sigurdson CJ., (2008) A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet Res* **39**: 41.
- Sigurdson CJ., Heikenwalder M., Manco G., Barthel M., Schwarz P., Stecher B., Krautler NJ., Hardt WD., Seifert B., MacPherson AJ., Corthesy I., Aguzzi A. (2009) Bacterial colitis increases susceptibility to oral prion disease. *J Infect Dis* **199 (2)**: 243-52.
- Simmons MM., Konold T., Simmons HA., Spencer YI., Lockey R., Spiropoulos J., Everitt S, Clifford D. (2007) Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res* **3**: 20.
- Simmons MM., Konold T., Thurston L., Bellworthy SJ., Chaplin MJ., Moore SJ. (2010)
The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res* **6**: 14.
- Simmons MM., Chaplin MJ., Konold T., Casalone C., Beck KE., Thorne L., Everitt S., Floyd T. Clifford D., Spiropoulos J. (2016). L-BSE experimentally transmitted to sheep presents as a unique disease phenotype. *Vet Res* **47 (1)**: 112.
- Sisková Z., Page A., O'Connor V, Perry VH. (2009) Degenerating synaptic boutons in prion disease: microglia activation without synaptic stripping. *Am J Pathol* **175 (4)**: 1610-21.
- Sisó S., González L., Jeffrey M., Martin S., Chianini F., Steele P. (2006) Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep. *Vet Rec* **159 (10)**: 327-8.

- Sisó S., Jeffrey M., González L. (2008). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol* **35 (3)**: 232-46.
- Sisó S., González L., Jeffrey M. (2010) Neuroinvasion in prion diseases: the roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010: 747892.
- Somerville RA., Birkett CR., Farquhar CF., Hunter N., Goldmann W., Dorman J., Grover D., Hennion RM., Percy C., Foster J., Jeffrey M. (1997) Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *J Gen Virol* **78 (Pt 9)**: 2389-96.
- Soto C. & Satani N. (2011) The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol Med* **17(1)**: 14–24.
- Soutyrine A., Huang H., Andrievskaia O., Walther I., Mitchell G. (2017) A novel approach for scrapie-associated prion (PrPSc) detection in blood using the competitive affinity of an aggregate-specific antibody and streptavidin to PrPSc. *Res Vet Sci* **113**: 115-121.
- Spagnolli G., Rigoli M., Orioli S., Sevillano AM., Faccioli P., Wille H., Biasini E., Requena JR. (2019) Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog* **15(7)**: e1007864.
- Sparkes RS., Simon M., Cohn VH., Fournier RE., Lem J., Klisak I., Heinzmann C., Blatt C., Lucero M., Mohandas T. (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **83**:7358-7562
- Spiropoulos J., Lockey R., Sallis RE., Terry LA., Thorne L., Holder TM., Eck KE., Simmons MM. (2011) Isolation of prion with BSE properties from framed goat. *Emerg Infect Dis* **17 (12)**: 2253-61.
- Spraker TR., Zink RN., Cummings BA., Wild MA., Miller MW., O'Rourke KI. (2002) Comparison of histological lesions and immunohistochemical staining of protease resistant prion protein in a naturally occurring spongiform encephalopathy of free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with those of chronic wasting disease of captive mule deer. *Vet.Pathol.* **39**: 110-119.

- Spraker TR., Balachandran A., Zhuang D., O'Rourke KI. (2004) Variable patterns of distribution of PrP^{CWD} in the obex and cranial lymphoid tissues of Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with subclinical chronic wasting disease. *Vet. Rec* **155**: 295–302.
- Spudich A., Frigg R., Kilic E., Kilic U., Oesch B., Raeber A., Bassetti CL., Hermann DM. (2005) Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* **20**: 442-449.
- Steele AD., Lindquist S., Aguzzi A. (2007) The prion protein knockout micde. *Prion* **1**: 83-93.
- Suzuki K., Grigorova I., Phan TG., Kelly LM., Cyster JG. (2009) Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J Exp Med* **206 (7)**: 1485-93.
- Takakura I., Miyazawa K., Kanaya T., Itani W., Watanabe K., Ohwada S., Watanabe H., Hondo T., Rose MT., Mori T., Sakaguchi S., Nishida N., Katamine S., Yamaguchi T., Aso H. (2011) Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol* **179 (3)**: 1301-9.
- Tamguney G., Giles K., Bouzamondo-Bernstein E., Bosque PJ., Miller MW., Safar J., DeArmond SJ., Prusiner SB. (2006) Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. *J. Virol.* **80**: 9104–9114.
- Telling GC., Parchi P., DeArmond SJ., Cortelli P., Montagna P., Gabizon R., Mastrianni J., Lugaresi E., Gambetti P., Prusiner SB. (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**: 2079-2082.
- Terry LA., Marsh S., Ryder SJ., Hawkins SA., Wells GA., Spencer YI. (2003) Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **152 (13)**: 387-92.
- Terry LA., Howells L., Hawthorn J., Edwards JC., Moore SJ., Bellworthy SJ., Simmons H., Lizano S., Estey L., Leathers V., Everest SJ. (2009) Detection of PrP^{Sc} in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Virol* **83 (23)**: 12552-8.

- Terry LA., Howells L., Bishop K., Baker CA., Everest S., Thorne L., Maddison BC., Gough KC. (2011) Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet Res* **42**: 65.
- Thackray AM. & Bujdoso R (2002) PrP_(C) expression influences the establishment of herpes simplex virus type 1 latency. *J Virol* **76**: 2498-2509.
- Thompson A., MacKay A., Rudge P., Lukic A., Porter MC., Lowe J., Collinge J., Mead S. (2014) Behavioral and psychiatric symptoms in prion disease. *Am J Psychiatry* **171** (3): 265-74.
- Thomsen BV., Schneider DA., O'Rourke KI., Gidlewski T., McLane J., Allen RW., McIsaac AA., Mitchell GB., Keane DP., Spraker TR., Balachandran A. (2012) Diagnostic accuracy of rectal mucosa biopsy testing for chronic wasting disease within white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) herds in North America: effects of age, sex, polymorphism at PRNP codon 96, and disease progression. *J Vet Diagn Invest* **24** (5): 878-87.
- Thorne L. & Terry LA. (2008) In vitro amplification of PrP^{Sc} derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J Gen Virol* **89** (Pt 12): 3177-84.
- Tuo W., O'Rourke KI., Zhuang D., Cheevers WP., Spraker TR., Knowles DP. (2002) Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (9): 6310-5.
- Tuo W., Zhuang D., Knowles DP., Cheevers WP., Sy MS., O'Rourke KI. (2001) Prp-c and Prp-Sc at the fetal-maternal interface. *J Biol Chem* **276** (21): 18229-34.
- Turner M., Gulbranson-Judge A., Quinn ME., Walters AE., MacLennan IC., Tybulewicz VL. (1997) Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J Exp Med* **186** (12): 2013-21.
- Uboldi C., Del Vecchio I., Foti MG., Azzalin A., Paulis M., Raimondi E., Vaccari G., Agrimi U., Di Guardo G., Comincini S., Ferretti L. (2005) Prion-like Doppel gene (PRND) in the goat: genomic structure, cDNA, and polymorphisms. *Mamm Genome* **16** (12): 963-71.

- Vaccari G., Petraroli R., Agrimi U., Eleni C., Perfetti MG., Di Bari MA., Morelli L., Ligios C., Busani L., Nonno R., Di Guardo G. (2001) PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. Brief report. *Arch Virol* **146 (10)**: 2029-37.
- Vaccari G., Di Bari MA., Morelli L., Nonno R., Chiappini B., Antonucci G., Marcon S., Esposito E., Fazzi P., Palazzini N., Troiano P., Petrella A., Di Guardo G., Agrimi U. (2006) Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J Gen Virol* **87 (Pt 5)**: 1395-402.
- Vaccari G., Scavia G., Sala M., Cosseddu G., Chiappini B., Conte M., Esposito E., Lorenzetti R., Perfetti G., Marconi P., Scholl F., Barbaro K., Bella A., Nonno R., Agrimi U. (2009) Protective effect of the AT137RQ and ARQK176 PrP allele against classical scrapie in Sarda breed sheep. *Vet Res* **40 (3)**: 19.
- Van den Berg TK., Yoshida K., Dijkstra CD. (1995) Mechanism of immune complex trapping by follicular dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **201**: 49-67.
- van Keulen LJ., Schreuder BE., Meloen RH., Mooij-Harkes G., Vromans ME., Langeveld JP. (1996) Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* **34 (5)**: 1228-31.
- van Keulen LJ., Schreuder BE., Vromans ME., Langeveld JP., Smits MA. (1999) Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol* **121 (1)**: 55-63.
- van Keulen LJ., Schreuder BE., Vromans ME., Langeveld JP., Smits MA. (2000) Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl* **(16)**: 57-71.
- van Keulen LJ., Vromans ME., van Zijderveld FG. (2002) Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS* **110 (1)**: 23-32.
- van Keulen LJ., Bossers A., van Zijderveld F. (2008) TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res* **39 (4)**: 24.

- van Keulen LJ., Vromans ME., Dolstra CH., Bossers A., van Zijderveld FG. (2008) Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch Virol* **153 (3)**: 445-53.
- Vargas F., Bolea R., Monleón E., Acín C., Vargas A., De Blas I., Luján L., Badiola JJ. (2005) Clinical characterisation of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. *Vet Rec* **156 (10)**: 318-20.
- Vascellari M., Nonno R., Mutinelli F., Bigolaro M., Di Bari MA., Melchiotti E., Marcon S., D'Agostino C., Vaccari G., Conte M., De Grossi L., Rosone F., Giordani F., Agrimi U. (2007) PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol* **81 (9)**: 4872-6.
- Vassallo N., Herms J., Behrens C., Krebs B., Saeki K., Onodera T., Windl O., Kretzschmar HA (2005). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* **332 (1)**: 75-82.
- Verma A. (2016) Prions, prion-like prionoids, and neurodegenerative disorders. *Ann Indian Acad Neurol* **19 (2)**: 169-74.
- Vorberg I., Groschup MH., Pfaff E., and Priola, S.A. (2003) Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform. *J Virol* **77**: 2003-2009.
- Wadsworth JD., Joiner S., Hill AF., Campbell TA., Desbruslais M., Luthert PJ., Collinge J. (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358 (9277)**: 171-80.
- Walker LC & Jucker M. (2015) Neurodegenerative diseases: expanding the prion concept. *Annu Rev Neurosci* **38**: 87-103.
- Watanabe T., Hiramatsu K., Ohmori Y., Paik YK. (1990) Histo- and cytochemical studies on the distribution of acetylcholinesterase-positive nerve fibers in the goat adrenal gland. *Anat Histol Embryol* **19 (3)**: 245-54.
- Weise J., Doeppner TR., Muller T., Wrede A., Schulz-Schaeffer W., Zerr I., Witte OW., Bahr M. (2008) Overexpression of cellular prion protein alters postischemic

Erk1/2 phosphorylation but not Akt phosphorylation and protects against focal cerebral ischemia. *Restor Neurol Neurosci* **26**: 57-64.

- Wells GA., Scott AC., Johnson CT., Gunning RF., Hancock RD., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle *Vet Rec* **121 (18)**: 419-420.
- Wells GA., Dawson M., Hawkins SA., Green RB., Dexter I., Francis ME., Simmons MM., Austin AR., Horigan MW. (1994) Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **135 (2)**: 40-1.
- Wemheuer WM., Benestad SL., Wrede A, Wemheuer WE., Brenig B., Bratberg B., Schulz-Schaeffer WJ. (2011) PrP^{Sc} spreading patterns in the brain of sheep linked to different prion types. *Vet Res* **42**: 32.
- Westaway D., Carlson G.A., Prusiner S.B. (1989) Unraveling prion diseases through molecular genetics. *Trends Neurosci* **12**: 221-227.
- Westaway D., Goodman PA., Miranda CA., McKinley MP., Carlson GA., Prusiner SB. (1987) Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* **51 (4)**: 651-62.
- Westergard L., Christensen HM., Harris DA. (2007) The Cellular Prion Protein (PrP^C): Its Physiological Function and Role in Disease. *Biochim Biophys Acta*: **1772 (6)**: 629-644.
- Wight PA. (1961) The histology of the spinal and sympathetic ganglia and the adrenal glands in scrapie disease of sheep. *J Comp Pathol* **71**: 53-9.
- Wilesmith JW., Ryan JB. (1997) Absence of BSE in the offspring of pedigree suckler cows affected by BSE in Great Britain. *Vet Rec* **141 (10)**: 250-1.
- Willard DM. (1936) The innervation of the adrenal glands of mammals; a contribution to the study of nerve-endings. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **78**: 475-485.
- Will RG., Ironside JW., Zeidler M., Cousens SN., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pollichieri M., Hofman A., Smith PG., (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in UK. *Lancet* **347 (9006)**: 921-5.

- Williams ES., Young S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* **16**: 89-98.
- Williams ES., Young S. (1992) Spongiform encephalopathies of Cervidae. In Transmissible spongiform encephalopathies of animals (R. Bradley & D. Matthews, eds). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **11 (2)**: 551-567.
- Wolfe LL., Spraker TR., González L., Dagleish MP., Sirochman TM., Brown JC., Jeffrey M., Miller MW. (2007) PrPCWD in rectal lymphoid tissue of deer (*Odocoileus* spp.). *J Gen Virol* **88 (Pt 7)**: 2078-82.
- Wroe SJ., Pal S., Siddique D., Hyare H., Macfarlane R., Joiner S., Linehan JM., Brandner S., Wadsworth JD., Hewitt P., Collinge J. (2006) Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368 (9552)**: 2061-67.
- Xanthopoulos K., Polymenidou M., Bellworthy SJ., Benestad SL., Sklaviadis T. (2009) Species and strain glycosylation patterns. *PloS One* **4 (5)**: e5633.
- Yokoyama T., Mohri S. (2008) Prion disease and emergencing prion disease. *Curr Med chem* **15 (9)**: 912-6.
- Zabel MD., Heikenwalder M., Prinz M., Arrighi I., Schwarz P., Kranich J., von Teichman A., Haas KM., Zeller N., Tedder TF., Weis JH., Aguzzi A. (2007) Stromal complement receptor CD21/35 facilitates lymphoid prion colonization and pathogenesis. *J Immunol* **179 (9)**: 6144-52.
- Zeng L., Zou W., Wang G. (2015) Cellular prion protein (PrP^C) and its role in stress responses. *Int J Clin Exp Med* **8 (5)**: 8042-8050.
- Zhu S., Victoria GS., Marzo L., Ghosh R., Zurzolo C. (2015) Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles. *Prion* **9 (2)**: 125-35.

SITI WEB CITATI

- www.rete-dida.it/dida/bio/prioni/soddu.htm
- <http://coloradodisasterhelp.colostate.edu/prefair/disease/dz/Scrapie.html>

- <http://academics.wellesley.edu/Chemistry/Chem101/aspirin/1mouton%20Scrapie.jpg>.
- <http://www.izsto.it> (report dati sanitari; sanità animale; scrapie)

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare al dottor Umberto Agrimi, coordinatore del dipartimento Sicurezza alimentare e Sanità animale dell' Istituto Superiore di Sanità (ISS) per averci gentilmente fornito il materiale biologico sul quale si è incentrato il presente lavoro. Un doveroso ringraziamento va parimenti rivolto ai Colleghi Romolo Nonno, Gabriele Vaccari e Michele Angelo Di Bari, afferenti al sopra citato dipartimento dell'ISS, per i risultati delle indagini laboratoristiche da essi condotte sugli ovini oggetto del presente lavoro.