



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS  
PRIÓNICAS EN ÓBEX DE BOVINO MEDIANTE  
INMUNOTRANSFERENCIA**

**PAULA NÚÑEZ RODRÍGUEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

**PROFESOR GUÍA: GUSTAVO FARÍAS ROLDÁN**

Financiamiento: Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile  
Centro de Biología y Biotecnología (CBB) del  
Instituto Milenio de la Universidad de Chile

**SANTIAGO, CHILE**

**2004**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS  
PRIÓNICAS EN ÓBEX DE BOVINO MEDIANTE  
INMUNOTRANSFERENCIA**

**PAULA NÚÑEZ RODRÍGUEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : GUSTAVO FARIAS ROLDAN	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO : RAQUEL CEPEDA CANALES	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO : CLAUDIO LECOCQ PARRA	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**

**2004**

## **1. RESUMEN.**

Existe un grupo de patologías neurodegenerativas letales que afectan a los humanos y a los animales denominadas encefalopatías espongiformes transmisibles (EET). En los humanos, destaca la enfermedad de Creutzfeldt Jacob (CJD), y la aparición en los últimos años de una nueva variante (nvCJD) que es causada por el agente de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE). Dentro de las EET animales, destaca el scrapie de ovinos y caprinos, y la BSE, que además de afectar al ganado bovino, es transmisible a los humanos.

La teoría más aceptada sobre el agente etiológico de estas enfermedades es la teoría del prión, que corresponde a una proteína priónica patológica (PrP<sup>sc</sup>) resistente a proteasas, que se origina por un cambio conformacional de una proteína priónica celular del huésped (PrP<sup>c</sup>).

La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) ha causado impacto mundial por el daño que ha provocado en la salud animal y en la economía, y por su relevancia en la salud pública al ser una enfermedad zoonótica. Durante años, el método de diagnóstico de rutina para la BSE fue el examen histopatológico del SNC de los bovinos sospechosos. Sin embargo, la epidemia desencadenada en Europa, principalmente en el Reino Unido, aumentó la necesidad de implementar métodos diagnósticos más rápidos y certeros. Esto originó el desarrollo de pruebas rápidas de diagnóstico, basadas en técnicas de inmunodetección del agente patológico (PrP<sup>sc</sup>) como es la inmunotransferencia o western blot.

El presente trabajo se orientó por una parte, a la purificación, caracterización y detección inmunológica de proteínas priónicas en óvex de bovinos, mediante la utilización de la inmunotransferencia. Para obtener la PrP<sup>c</sup>, se utilizó un método de purificación de proteínas priónicas, y en el caso de la PrP<sup>sc</sup> se utilizó una proteína priónica recombinante (PrP<sup>sc</sup>); además, se evaluó la respuesta de ambas proteínas frente a la actividad enzimática de la proteinasa K. Para la posterior caracterización y detección inmunológica de estas proteínas, se realizó una electroinmunotransferencia. Por otra parte, para evaluar un método

rápido de diagnóstico que detecte el agente de la BSE, se utilizaron 84 muestras de óbex de bovinos provenientes de mataderos de la Región Metropolitana, las que se analizaron individualmente por Western Blot mediante un *kit* comercial (Prionics Check-Western®), aceptado y utilizado internacionalmente para el monitoreo y diagnóstico de esta enfermedad.

Los resultados del presente estudio muestran la caracterización y detección inmunológica de la PrPc y la PrPrec mediante la inmunotransferencia. Además, se demuestra la sensibilidad a la digestión de ambas proteínas con la proteinasa K, lo que las diferencia de la PrPsc, que es una proteína proteasa resistente. En cuanto a los resultados obtenidos con el *kit* (Prionics Check-Western®), de las 84 muestras analizadas 60 arrojaron un resultado negativo a BSE, ya que no se detectó inmunológicamente la PrPsc. El resto de las muestras (24) fueron analizadas nuevamente por dar resultados inconclusos, al aparecer bandas en el rango de peso molecular de la PrPsc. Sin embargo, finalmente el total de las muestras (84) arrojaron resultados negativos a BSE, lo que indica que las muestras inconclusas eran falsas positivas originadas por una deficiente digestión enzimática de la PrPc.

La importancia de esta memoria de título radica en el hecho de ser pionera en la caracterización e inmunodetección de las proteínas priónicas de bovinos utilizando la inmunotransferencia, y en lograr la utilización e implementación en nuestro país de un método de diagnóstico rápido para BSE basado en un *kit* comercial, que es utilizado y aceptado internacionalmente para la detección del agente etiológico de esta patología.

## **2.- SUMMARY**

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) is a group of lethal neurodegenerative diseases that affects both humans and animals. In humans, it is important to highlight Creutzfeldt Jakob disease (CJD), and later, the appearance of a CJD variant (nvCJD) that is caused by the bovine spongiform encephalopathy (BSE) agent. In animals, the scrapie is important in sheep and goats, and BSE, apart from bovines, is transmissible to humans.

The most accepted theory about the etiologic agent of these diseases is a pathologic prion protein (PrP<sup>sc</sup>), protease resistant, originated by a conformational change of a normal host protein (PrP<sup>c</sup>).

Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) has caused world impact due to damage to animal health and economy, and also due to its importance in public health for being a zoonotic disease. For many years, the BSE diagnostic method was the histopathology of Central Nervous System (CNS). However, the epidemic which started in Europe, mainly in the United Kingdom, increased the need of implementing a quicker and more efficient diagnostic test. This originated the development of a rapid diagnostic test, based on pathologic agents (PrP<sup>sc</sup>) immunodetection techniques, such as immunotransference or western blot.

This work was based in the purification, characterization and immunologic detection of bovine obex prion proteins with the use of immunotransference. To obtain the PrP<sup>c</sup>, a prion purification method was carried out. In the PrP<sup>sc</sup> case a recombinant prion protein (PrP<sup>rec</sup>) was used. Furthermore, the response of both proteins to the Proteinase K enzymatic activity was evaluated. An electroimmunotransference was carried out in order to characterize and immunologically detect these proteins. In the other hand, in order to evaluate a quick diagnostic test which detects the BSE agent, 84 bovine obex samples from Metropolitan region were used. These were analysed individually by a western blot

using a commercial *kit* (Prionics® Check-Western), which is internationally used and accepted to survey and diagnose this disease.

The results of this study showed PrPc and PrP<sup>sc</sup> characterization and immunological detection through immunotransference. Furthermore, the sensibility to digest both proteins with the Proteinase K was shown, which sets them apart from PrP<sup>sc</sup>, which is a protease resistant protein. Regarding the results obtained from using the *kit* (Check-Western®), of the 84 analysed samples, 60 were negatives to the BSE, due to the fact that PrP<sup>sc</sup> was not detected immunologically. The rest of the samples (24) were analyzed again since they had not given a clear result, appearing signals in the range of PrPc molecular weight. Finally, all the 84 samples gave negative results to BSE, which indicates that the 24 samples were false positives, originated by PrPc deficient enzymatic digestion.

The importance of this study, is to be pioneer in Chile in the characterization and immunodetection of bovine prion proteins using immunotransference, in to achievement and implementation in our country of a rapid BSE diagnosis test, based in the commercial *kit* which is internationally accepted and utilized to detect this pathology's agent of this disease.

### **3. INTRODUCCION.**

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades causadas por priones, son un grupo de patologías neurodegenerativas fatales que afectan a los humanos y a los animales. En los humanos, han sido descritas varias formas de estas enfermedades: kurú, Creutzfeldt Jacob (CJD), Gertsman-straissler-scheinker (GSS), insomnio familiar fatal (IFF) y últimamente, una nueva variante de CJD (nvCJD). En los animales, el scrapie en los ovinos y caprinos, la encefalopatía espongiforme transmisible del ganado bovino (BSE), la encefalopatía transmisible del visón (TME), la enfermedad del desgaste crónico (CWD) en ciervos y alces, y la encefalopatía espongiforme felina (FSE) en felinos. Estas enfermedades incluyen una fase psíquica, con cambios en el comportamiento y temperamento, y una fase orgánica donde se observan alteraciones motoras graves.

En todos los casos, el desarrollo de la enfermedad y los tiempos de incubación son extremadamente prolongados, con ausencia total de síntomas. Macroscópicamente, los cerebros de los individuos infectados aparecen normales, mientras que microscópicamente los mayores cambios consisten en astrogliosis, vacuolización intracelular, pérdida neuronal y formación de placas amiloides ocasionales.

La teoría más aceptada sobre el agente causal de las EET corresponde a la de una proteína priónica celular (PrPc), que posterior a un cambio conformacional origina una proteína priónica patógena (PrPsc) responsable de causar este grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales, tanto en humanos como en animales.

Dentro de las EET animales destaca la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) que afecta al ganado bovino, y que ha causado una serie de daños en el ámbito de la salud animal, y por consiguiente, en el área económica y, además, en los últimos años ha aumentado su importancia como entidad patológica, al descubrirse su transmisión al ser humano, causando la nueva variante de CJD (nvCJD), por lo que se considera una enfermedad zoonótica.

El diagnóstico *in vivo* de la BSE se realiza mediante la observación de los signos clínicos del animal, siendo de tipo presuntivo, mientras que los métodos de diagnóstico actualmente utilizados en nuestro país, corresponden al examen histopatológico e inmunohistoquímico del Sistema Nervioso Central de los animales afectados. En la actualidad, los países que poseen la enfermedad han implementado nuevas técnicas diagnósticas de rutina, basadas en la detección inmunológica de la PrPsc en el tejido nervioso, como son la inmunotransferencia (Western Blot) y el método de enzimoimmunoensayo (ELISA).

En nuestro país, el Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.) ha desarrollado un programa nacional de vigilancia epidemiológica de BSE, dentro del cual se incluye la implementación de nuevos métodos de diagnóstico, recomendados internacionalmente para detectar el agente causal de esta patología. Dentro de este contexto, se enmarca la presente Memoria de Título, que está orientada a implementar la inmunotransferencia como un método diagnóstico de BSE en nuestro país.



#### **4. REVISION BIBLIOGRAFICA.**

##### **Generalidades.**

Se ha descrito un grupo de patologías neurodegenerativas fatales que afectan a los humanos y a los animales, denominadas encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades causadas por priones. Entre ellas, destaca la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD) y su nueva variante (nvCJD) en el hombre, el scrapie de los ovinos y caprinos, y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en el ganado vacuno. Esta última patología se diagnosticó por primera vez en Gran Bretaña el año 1986, afectando posteriormente a otros países del mundo, lo que ha provocado grandes daños no sólo en el ámbito de la salud animal, sino que también, en el área económica y de salud pública (Castilla *et al.*, 2002).

Estas patologías cursan con un elevado tiempo de incubación, signos neurológicos progresivos y cambios morfológicos degenerativos en el Sistema Nervioso Central (SNC), que terminan con la muerte del individuo (Torres *et al.*, 2001).

La teoría más aceptada sobre el agente causante de estas enfermedades es la teoría del prión (partícula infecciosa proteica), la que corresponde a la forma alterada de una proteína celular (PrP<sup>c</sup>) que ha perdido su función normal, pero que ha adquirido la capacidad de transformar la forma normal en patológica (PrP<sup>sc</sup>). Estos agentes son capaces de propagarse dentro del Sistema Nervioso de un mismo huésped causando una lesión espongiforme degenerativa en el tejido nervioso central y de transmitirse de un huésped a otro con elevados tiempos de incubación (Gasset y Westaway, 2001). Las EET se clasifican en enfermedades de tipo hereditarias, cuando su presentación se debe a una mutación en el gen que codifica la PrP<sup>c</sup>; de tipo adquiridas, cuando la infección es producto del ingreso al organismo de una PrP<sup>sc</sup> exógena; y de tipo esporádicas, cuando se presentan sin evidencia de una mutación puntual o infección exógena con la PrP<sup>sc</sup> (Lasmezas, 2003).

## **Enfermedades priónicas humanas.**

Las enfermedades priónicas que afectan a los humanos se presentan como patologías que pueden ser de tipo esporádicas, hereditarias y desórdenes neurodegenerativos transmisibles. Estas enfermedades son subdivididas sobre la base de la signología clínica y de las características neuropatológicas que presentan, y corresponden al kurú, enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD), Gerstmann-sträussler-scheinker (GSS), insomnio familiar fatal (FFI), y últimamente una nueva variante de CJD (nvCJD) que a diferencia de las anteriores, está directamente relacionada con la encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) por lo que corresponde actualmente a una zoonosis (DeArmond y Prusiner, 1995).

### **- Kurú.**

Esta patología fue descrita en el año 1957 por Vincent Zigas y Carleton Gajdusek, quienes revelaron que muchos habitantes de la población Fore de Nueva Guinea habían adquirido una extraña enfermedad, caracterizada por ataxia y que terminaba con demencia y muerte. Esta patología afectaba a las mujeres y a los niños, los que contrajeron la enfermedad durante ritos canibalísticos en que consumían principalmente los cerebros (Prusiner, 1995; Liberski y Jaskólski, 2002; Lasmezas, 2003). La infección ocurría por ingestión, a través de cortes o abrasiones de la piel, y por contacto con los ojos o las mucosas (Lasmezas, 2003). Luego del cese de estos rituales, la enfermedad ha ido desapareciendo, hasta ser abolida por completo (Prusiner, 1995). Debido a que el canibalismo también era practicado en otras regiones sin que se presentaran casos de kurú, se ha sugerido, que pudiera tratarse en realidad de la misma enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD), en que a partir de un caso esporádico se habría transmitido de forma importante a una comunidad en la que el canibalismo era una práctica habitual. En los casos estudiados no se han descrito mutaciones en el gen codificador de la PrPc (PRNP), aunque sí una mayor frecuencia de sujetos homocigotos a Metionina en el codón 129 de dicho gen (Domínguez *et al.*, 1998; Weissman *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2004).

Los pacientes afectados por esta patología presentaban dificultad para caminar y exhibían signos de progresiva disfunción cerebelar. Generalmente, las víctimas del kurú fallecían aproximadamente después de 1 año, presentando ataxia troncal y de extremidades. En la autopsia se encontraron cambios espongiiformes y gliosis a través de ambos hemisferios cerebrales y en el cerebelo. En aproximadamente el 70% de los casos, las placas amiloides constituidas por proteína priónica (PrPsc) estaban presentes (DeArmond y Prusiner, 1995).

### **- Enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD).**

La CJD fue descrita por primera vez en el año 1920 por Creutzfeldt en una mujer que presentaba un alto grado de demencia, y un año después, Jacob informó de otros 3 casos con idéntica signología clínica (Domínguez *et al.*, 1998). Aunque la CJD generalmente se presenta con demencia, mioclonos multifocales y cambios trifásicos en el electroencefalograma, cerca del 10% de los casos se manifiesta como una enfermedad atáxica. Al examen histopatológico se observan cambios espongiiformes y gliosis a través de la materia gris. En aproximadamente el 10% de los casos, las placas amiloides de PrPsc están presentes (DeArmond y Prusiner, 1995). La CJD tiene una presentación a nivel mundial, reconociéndose tres formas de esta enfermedad y una nueva variante de esta patología.

**a) CJD esporádica**, es el tipo más común en aproximadamente el 85% de los casos. Usualmente, afecta a individuos entre los 50 a 75 años de edad, con una incidencia similar en ambos sexos, y se caracteriza por una rápida y progresiva demencia con trastornos conductuales (DeArmond y Prusiner, 1995; Domínguez *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2004). En un 33% de los casos, destacan las alteraciones visuales o los síntomas cerebelosos respecto a la demencia. Suele haber mioclonías, rigidez, nistagmos y temblores musculares. El tiempo que media desde el inicio de la enfermedad hasta que se produce la muerte es de 7 a 9 meses (Domínguez *et al.*, 1998). Su incidencia a nivel mundial es de 1 caso por un millón de habitantes al año (DeArmond y Prusiner, 1995; Domínguez *et al.*, 1998).

En los pacientes con este tipo de CJD se ha identificado un polimorfismo común de la proteína priónica en el residuo 129, lugar donde es codificada una metionina o una valina, lo que resulta clave para determinar una susceptibilidad genética para las enfermedades priónicas esporádicas. Es así, como los individuos homocigotos para el codón 129 (Metionina o Valina) son más susceptibles a esta CJD que los individuos heterocigotos, efecto protector que también ha sido visto en casos de CJD hereditaria (Collinge, 1999; Trevitt y Singh, 2003).

**b) CJD hereditaria**, corresponde aproximadamente entre el 10 al 15% de los casos y es una enfermedad hereditaria asociada a mutaciones en el gen de la PrPc en uno de los siguientes codones: 102, 105, 117, 145, 178, 180, 198, 200, 210, 217 y 232 (Prusiner, 1995; Domínguez *et al.*, 1998). Para las formas familiares no se conoce la transmisión vertical en condiciones naturales, así como tampoco se ha producido dicha transmisión en animales que habían contraído la enfermedad de forma experimental (Domínguez *et al.*, 1998).

**c) CJD iatrogénica**, en 1974 se describió por primera vez un caso iatrogénico de CJD (Domínguez *et al.*, 1998). Se presenta en menos del 5% de los casos, y es el resultado de la transmisión del agente debido a transplantes de córnea, implantes de duramadre, utilización de electrodos en el cerebro o inyección de hormona del crecimiento proveniente de individuos enfermos (Prusiner, 1995; Collins *et al.*, 2004). Generalmente, la inoculación periférica de PrPsc y los implantes de duramadre infectada están asociados con la presentación atáxica de la enfermedad, mientras que en los casos con introducción directa de la PrPsc al cerebro (incluyendo transplantes de córnea) la presentación es con demencia (Collins *et al.*, 2004).

**d) Nueva variante de CJD (nvCJD)**, a fines de la década de 1980, la posibilidad que la BSE pudiera ser transmisible a la población humana fue considerada por muchos científicos como improbable. Sin embargo, en el Reino Unido en Marzo de 1996, fueron identificados 10 casos de pacientes que fallecieron como promedio a una edad de 29 años, con una inusual presentación clínica y patológica de la CJD. A continuación en la Tabla N°1 se

presentan las principales diferencias entre la forma clásica o esporádica de CJD (CJDs) y esta nueva variante (nvCJD) (Will, 2002; Collins *et al.*, 2004).

**Tabla N° 1.** Características diferenciales entre la CJDs y la nvCJD.

	<b>CJDs</b>	<b>NvCJD</b>
Edad promedio de muerte	66 años	29 años
Duración promedio de la enfermedad.	4 meses	13 meses
Características clínicas.	Demencia de rápida progresión y mioclonías, asociado con déficit neurológicos multifocales como disfagia y ataxia.	Ataxia, cambios de comportamiento, daño cognitivo. Deterioro neurológico progresivo lento.
Características del EEG.	Complejos periódicos trifásicos característicos en el 60-70% de los casos.	Sin características especiales.
Características neuropatológicas (PrPsc)	Acumulación en sinapsis.	Depósitos extensos de placas floridas.
Genotipo <i>PRNP</i> codón 129	68% homocigotos Met/Met	100% Met/Met

Surgió entonces, la incógnita respecto a esta nueva entidad clínica, lo que incentivó a la realización de diversos estudios para determinar el origen de esta presentación. Es así, como la evidencia experimental demostró que esta nueva variante de CJD era adquirida debido al consumo de tejidos procedentes de ganado bovino afectados con BSE (Will, 2002). Se demostró, que el isotipo de la proteína priónica (PrPsc) que se acumula en el cerebro de los pacientes con nvCJD, es similar a la PrPsc de la BSE transmitida experimentalmente, pero diferente a los de la CJD esporádica, considerando los patrones de glicosilación observados en el Western Blot (Hill *et al.*, 1997; Collinge, 1999; Will, 2002). En los individuos infectados por la nvCJD es posible encontrar un perfil de glicosilación de

PrPsc (denominado tipo IV) claramente diferenciable de los CJD esporádico o iatrogénico (tipos I a III) (Collinge, 1999). Sin embargo, son muy similares a los patrones de glicosilación observados en gatos infectados con priones de la encefalopatía espongiforme felina (FSE), visones con encefalopatía espongiforme del visón (TME) o macacos infectados con priones de BSE (Collinge *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Castilla *et al.*, 2002). Por otra parte, al inocular experimentalmente tejidos infectados con BSE a primates, se observa la presencia de depósitos de PrPsc en el SNC como extensas placas floridas, lo que fue crítico para la identificación de esta nvCJD y la hipótesis de su relación con la BSE. Además, estudios de transmisión en ratones transgénicos que expresan el gen de la PrPc humano o bovino, demostraron que las características de transmisión de la nvCJD, incluyendo el período de incubación y la distribución de las características neuropatológicas, eran muy similares para la BSE y la nvCJD, y muy distintas de la CJD esporádica (CJDs) (Will, 2002; Trevitt y Singh, 2003).

**- Gerstmann-straüssler-scheinker (GSS).**

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1936, en una familia que presentaba una enfermedad neurodegenerativa transmitida por herencia autosómica dominante con alteraciones cerebelosas y demencia. Su incidencia es muy baja, correspondiendo entre 1 - 10 casos por 100 millones de habitantes. Algunas familias afectadas presentan una mutación en el codón 102 o 105 del gen de la PrPc, en que se sustituye una leucina por prolina; en otras se sabe que la mutación está en el codón 117, con sustitución de valina por alanina. Se ha sugerido que la mutación del codón 102 se relacionaría con las formas en las que predomina la ataxia, y la mutación del codón 117 con las formas en las que la demencia es más pronunciada (Domínguez *et al.*, 1998).

La enfermedad se inicia entre los 40 a 70 años de edad, y los pacientes frecuentemente presentan ataxia troncal y de miembros por 6 a 10 años antes de la muerte. Un menor porcentaje de los pacientes cursan con demencia o la desarrollan en el transcurso de la enfermedad. Las mioclonías, a diferencia de lo que ocurre con CJD, son de escasa presentación. La característica neuropatológica más prominente de GSS es la presencia de

placas amiloides de PrPsc (DeArmond y Prusiner, 1995; Domínguez *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2004), principalmente en el cerebelo y en el córtex cerebral (Brown, 2000).

#### **- Insomnio Familiar Fatal (IFF).**

Se describió en Italia en 1986 debido a la presentación de 2 casos en una misma familia. El inicio de la enfermedad se produce entre los 35 y los 60 años de edad, y los pacientes cursan con un insomnio progresivo, hiperhidrosis, hipertermia, taquicardia, hipertensión, ataxia, mioclonías y alucinaciones. Desde que aparecen los primeros síntomas hasta la muerte transcurren de 7 a 36 meses (Domínguez *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2004).

Las personas afectadas por el cuadro presentan una mutación en el codón 178 del gen de la PrPc, por la que se sustituye una asparagina por ácido aspártico (DeArmond y Prusiner, 1995; Domínguez *et al.*, 1998).

La neuropatología está, usualmente, confinada al tálamo, especialmente los núcleos mediodorsal y ánteroventral, y se caracteriza por pérdida neuronal, gliosis y ocasionalmente degeneración espongiiforme (DeArmond y Prusiner, 1995; Collins *et al.*, 2004).

#### **Enfermedades priónicas animales.**

En los animales, han sido descritas diversas encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET): el scrapie que afecta a ovinos y caprinos, la encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), la encefalopatía transmisible del visón (TME), la enfermedad del desgaste crónico (CWD) en ciervos y alces, y la encefalopatía espongiiforme felina (FSE) en gatos (Hur *et al.*, 2002).

#### **- Scrapie.**

Esta patología afecta a los ovinos y a los caprinos, y fue la primera encefalopatía espongiiforme transmisible o enfermedad priónica reconocida en mamíferos (O.I.E., 2000;

Lasmezas, 2003). La transmisión experimental del scrapie natural, que es el prototipo animal de las enfermedades priónicas humanas, fue convincentemente demostrada en 1938 (DeArmond y Prusiner, 1995).

La patogénesis del scrapie en rumiantes y modelos roedores ha sido estudiada por Hadlow, Scottish y Dickinson, quienes demostraron a comienzos de 1980 la existencia de una susceptibilidad genética para estas enfermedades que, combinada con un componente infeccioso, determinaría las características de la enfermedad (Lasmezas, 2003).

Fue descrita por primera vez en Inglaterra en el año 1732, siendo desde entonces enzoótica en el Reino Unido (Domínguez *et al.*, 1998). Es considerada endémica en muchos países europeos y ha sido también reportada en diversos países a través de otros continentes. Sin embargo, Australia y Nueva Zelanda han mantenido su condición de país libre de scrapie debido a rigurosas medidas de control (O.I.E., 2000).

Su transmisión es por vía vertical y horizontal. La infección de los corderos ocurre en el momento del parto, y posiblemente en el período prenatal. Las membranas fetales son una fuente importante de transmisión entre animales no emparentados, especialmente cuando las zonas de parto están en áreas confinadas (Domínguez *et al.*, 1998; O.I.E., 2000). A pesar de que la causa del scrapie reside en un agente infeccioso, es un gen ovino y caprino específico, denominado Sip (Scrapie incubation period) el que influye en la duración del período de incubación y en la sensibilidad al scrapie natural y experimental (Domínguez *et al.*, 1998).

El período de incubación de esta enfermedad fluctúa entre los 14 y 22 meses (Castilla *et al.*, 2002). La mayoría de los casos clínicos se presentan en animales entre los 2 a 5 años de edad, siendo rara su presentación en menores de 1 año de edad. Los signos clínicos varían ampliamente en cada animal afectado, y tienen un desarrollo muy lento. Los primeros en aparecer, incluyen cambios en el comportamiento y en el temperamento, a lo que sigue la tendencia del animal a rascar y frotar su cuerpo contra objetos fijos, para aliviar el prurito que se presenta. Como consecuencia de esto último, hay pérdida de lana,



particularmente sobre el tórax lateral, flancos y cuartos traseros. Otros signos clínicos evidenciables son la pérdida de coordinación, exagerada ingesta de líquido, pérdida de peso, mordeduras en las patas y anomalías en el movimiento, frecuentemente acompañadas de temblores y convulsiones. Los signos clínicos pueden confundirse, especialmente en la fase temprana de la enfermedad, con los de otras patologías, como pseudorabia (enfermedad de Aujeszky), ectoparasitismo, rabia, encefalitis por *Listeriosis*, Maedi Visna, cetosis, hipomagnesemia e intoxicaciones químicas y por plantas (O.I.E., 2000).

El análisis histopatológico de los cerebros muestra astrogliosis, vacuolización intracelular y pérdida neuronal. No parece existir una relación entre la cantidad de astrogliosis observada y la gravedad de las lesiones vacuolares, por lo que ambos cambios parecen representar respuestas primarias independientes. Se han descrito también alteraciones en el páncreas (Castilla *et al.*, 2002).

El scrapie ha sido transmitido experimentalmente a otros rumiantes, primates, gatos y a una amplia variedad de roedores (Lasmezas, 2003).

#### **- Encefalopatía transmisible del visón (TME).**

Es una enfermedad que afecta al Sistema Nervioso Central de visones criados en granjas. Se detectó, inicialmente, en Estados Unidos en el año 1947, no volviéndose a presentar nuevos brotes hasta principios del año 1960. Desde entonces, se han descrito nuevos casos en Canadá, Europa Occidental y en repúblicas de la antigua Unión Soviética (Castilla *et al.*, 2002).

La fuente de infección es exógena, siendo expuestos los visones a través de alimentos contaminados con priones. Los ganaderos dedicados a la crianza del visón, incluyeron en su alimentación desperdicios de matadero y cadáveres de animales sin tratar, aún cuando no ha sido posible demostrar la alimentación con material ovino o bovino infectado en todos los brotes. Estudios de inoculación intracerebral de TME en ganado, muestra algunas similitudes con la BSE, como el período de incubación, los signos clínicos

y las lesiones neuropatológicas, pero la distribución de las lesiones en el ganado inoculado es distinta de las observadas con la BSE. Las lesiones en el ganado expuesto a TME, también fueron distintas a las observadas en el ganado con scrapie. Esta se trata de una enfermedad cerrada, sin vías naturales de transmisión entre visones, salvo en casos de canibalismo (Williams y Miller, 2003).

Su período de incubación promedio es de 7 meses. Los síntomas pueden aparecer entre 3 días hasta 6 semanas. Los signos más tempranos incluyen un aumento de la suciedad de la madriguera y dispersión de residuos por toda la jaula. A medida que la enfermedad progresa, el animal se muestra más excitado y manifiesta una descoordinación severa, con espasmos pronunciados en los miembros traseros (Castilla *et al.*, 2002).

La infección natural y experimental muestra una microvacuolización de la materia gris en el córtex cerebelar, cuerpo estriado y cerebro medio (Castilla *et al.*, 2002).

La TME ha sido experimentalmente transmitida a ovinos, caprinos y hámster, pero podría no ser transmisible al ratón (Lasmezas, 2003).

#### **- Enfermedad del desgaste crónico (CWD).**

Es una encefalopatía espongiiforme transmisible que afecta a ungulados domésticos y salvajes. El primer caso data de 1967, correspondiendo a un ciervo mula en cautividad (*Odocoileus hemionus*) de Colorado. La enfermedad se caracterizó como una pérdida de peso crónica que terminaba con la muerte. Prácticamente todos los casos reportados hasta la actualidad se han presentado en Norteamérica, Colorado y Wyoming. No se ha demostrado transmisión entre la CWD y otras EET en animales o en el hombre (Castilla *et al.*, 2002). Hasta la fecha, el origen de esta enfermedad no ha sido dilucidado exactamente (Williams y Miller, 2003).

Las especies que han sido afectadas son el gran kudu (*Tragalaphus strepsieros*), ábigo (*Odocoileus leucoryx*), ciervo de pelo blanco (*Odocoileus virginianus*), ciervo de pelo negro (*Odocoileus hemionus*), y alce (*Cervus elaphus*) (Castilla *et al.*, 2002).

Esta enfermedad se presenta en animales de ambos sexos, enteros o castrados, con edades comprendidas entre 2,5 a 7 años de edad. Los signos clínicos consisten en pérdida de peso progresiva, apatía, depresión, ataxia, deshidratación, caída de cabeza y orejas, salivación excesiva, polidipsia y poliuria. Se altera el comportamiento disminuyendo el miedo a los humanos y la interacción con otros individuos del grupo. El animal muere a los 6 meses de aparecer los síntomas (Castilla *et al.*, 2002).

Los datos almacenados desde las epidemias de CWD en los ungulados cautivos, proveen una fuerte evidencia que la enfermedad es contagiosa y transmitida lateralmente. Sin embargo, el mecanismo exacto de transmisión es aún desconocido (Williams y Miller, 2003).

Microscópicamente se observan lesiones en el cerebro y en la médula espinal con microcavitaciones de la sustancia gris y placas amiloides (Torres *et al.*, 2001).

#### **- Encefalopatía Espongiforme Felina (FSE).**

Se diagnosticó por primera vez en 1990 en un gato doméstico en Inglaterra. Su incidencia en el Reino Unido es de 10 a 15 gatos infectados por un millón. Además, se han descrito casos en pumas, ocelotes y tigres. La infección se debió a la contaminación del alimento con tejido bovino infectado con BSE (Castilla *et al.*, 2002).

En todos los casos se presenta una signología común, caracterizada por tremor muscular generalizado, ataxia y dilatación pupilar. La mayor parte de los casos diagnosticados han aparecido en individuos con una edad comprendida entre los 4 y 9 años. Los estudios inmunohistoquímicos han evidenciado la presencia de PrPsc en el cerebro y en la médula espinal (Castilla *et al.*, 2002).

## **- Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE).**

El primer caso de esta enfermedad fue observado en el año 1985, en una vaca Frison de una granja del sur de Inglaterra, con un síndrome neurológico descrito como hipersensibilidad crónica con descoordinación marcada. En este animal se describió un cambio de carácter acompañado de comportamientos agresivos. Siete meses después, en el mismo rebaño, se presentaron nueve casos más con los mismos signos clínicos. En noviembre de 1986, el análisis histopatológico del cerebro de estos animales reveló una gran similitud con los cerebros de los animales infectados con scrapie (Castilla *et al.*, 2002). La confirmación que la BSE se originó debido a un agente transmisible asociado a scrapie, fue obtenida cuando esta encefalopatía espongiforme fue satisfactoriamente transmitida a distintas estirpes de ratones como resultado de la inoculación intracerebral de material infeccioso de BSE (Wilesmith, 1994).

La ausencia de un método de diagnóstico práctico, que permitiera la identificación de animales en fases preclínicas, obligó al sacrificio masivo de animales como medida preventiva, haciendo necesario profundizar en la etiología, patogenia y obtención de métodos de diagnóstico para esta enfermedad (Castilla *et al.*, 2002).

### **Etiología.**

Durante muchos años, los científicos se referían al agente infeccioso que causaba las encefalopatías espongiformes transmisibles como un virus lento, debido a su larga progresión y a las propiedades inusuales que presenta. La extrema resistencia del agente del scrapie a la radiación ultravioleta e ionizante, despertó el interés de muchos investigadores sobre la naturaleza de este agente infeccioso (DeArmond y Prusiner, 1995). Tal como los virus, el agente de las EET pasa a través de los filtros más bajos en el rango micrométrico y es, en este aspecto, comparable al agente responsable de otras infecciones lentas de rumiantes como el Maedi-Visna. Similarmente a otros virus lentos, este agente muestra un tropismo por el sistema retículo endotelial, adaptándose a nuevos huéspedes y abarcando diversas variantes de virulencia y de patogenicidad (Lasmizas, 2003).

Otra hipótesis formulada sobre el agente causal de las EET fue la del virino, la que estaba basada, tanto en la observación de la ausencia de reacción inmune en el huésped afectado, como así también, en la existencia de diversas cepas del agente de scrapie y su capacidad de experimentar mutaciones, lo que servía como un indicador de poseer un genoma independiente. El virino se planteó como una molécula informacional (probablemente un ácido nucleico) más una proteína del huésped, que podría relacionarse con la neutralización inmunológica del virino y la resistencia de las defensas del huésped. La teoría del virino “moderno” podría ser considerada como un complejo entre un ácido nucleico, también pequeño, que codifica alguna proteína, y la proteína priónica del huésped (PrPc). Esto plantea, que la infectividad del agente podría marcar una conformación anormal a través de la interferencia con el metabolismo normal del huésped (Lasmezas, 2003).

Por otra parte, se formularon hipótesis que planteaban que el agente de las EET era solamente una proteína autoreplicativa, o bien un pequeño ácido nucleico asociado con un componente del huésped. Sin embargo, en el año 1981, Prusiner descubrió que la fracción infecciosa contenía una proteína hidrofóbica que co-purificaba con la infectividad. El planteó que esta proteína era el agente infeccioso y la denominó prión, que es la abreviación de “partícula infecciosa proteinacea”(Bolton *et al.*, 1982; Lasmezas, 2003). De este modo, el término prión fue introducido para distinguir el patógeno causante de scrapie de los virus y viroides, al descubrir que su infectividad no era atenuada por procedimientos que modifican ácidos nucleicos e inactivan a los virus, pero que sí era inactivada por tratamientos que alteran proteínas (DeArmond y Prusiner, 1995). Además, estos no provocan una respuesta inflamatoria responsable de antigenicidad detectable en el huésped (Torres *et al.*, 2001; Lasmezas, 2003).

Los priones se componen de una proteína denominada PrPsc (isoforma scrapie o patológica de la proteína prión), que se produce por el plegamiento erróneo de una proteína celular de idéntica secuencia de aminoácidos (253-254 aminoácidos, de 33-35 kDa), presente en prácticamente todos los tejidos del organismo, denominada PrPc (isoforma celular de la proteína prión). Este plegamiento erróneo confiere a la PrPsc dos propiedades

que permiten diferenciarla de la PrP<sup>c</sup>, la resistencia parcial a la digestión con proteasas y la insolubilidad (Torres *et al.*, 2001). Bajo el tratamiento con proteinasa K, la proteína celular normal (PrP<sup>c</sup>) se destruye completamente, mientras que la PrP<sup>sc</sup> reduce su tamaño original de 33-35 kDa a 27-30 kDa, producto de la proteólisis limitada de 67 aminoácidos de su extremo N-terminal. A este fragmento remanente de PrP<sup>sc</sup>, proteasa resistente, se le denomina PrP 27-30 o PrP<sup>res</sup>, y es la forma en que se deposita intracelularmente en el organismo formando fibrillas denominadas fibras asociadas a scrapie (SAF). Estas tienen un diámetro de 11 nm, con una longitud promedio de 165 nm (125-350 nm) y se observan mediante microscopía electrónica de una forma recta y lisa muy similares a bastones. La acumulación de estas fibrillas en el SNC es lo que conduce a la degeneración y muerte neuronal (Torres *et al.*, 2001). Esta PrP<sup>res</sup> o PrP 27-30, para el caso de la BSE, posee un patrón electroforético característico de 3 bandas glicosiladas, lo que permite identificarla y caracterizarla mediante la técnica diagnóstica de western blot (C.E., 1999).

La proteína priónica patógena se caracteriza por su alta resistencia a la inactivación. La PrP<sup>sc</sup> resiste la inactivación por nucleasas, radiación UV a 254 nm, tratamiento con psoralenos, cationes divalentes, iones metálicos quelantes, ácidos (entre pH 3 y 7), hidroxilamina, formalina, ebullición y proteasas. La infectividad de los priones se puede disminuir mediante la digestión prolongada con proteasas, con tratamientos como úrea, ebullición con SDS, álcali (pH > 10), autoclave a 132°C durante más de 2 horas, solventes orgánicos desnaturizantes (fenol), o agentes caotrópicos como el isocianato de guanidina (Torres *et al.*, 2001).

La proteína priónica celular (PrP<sup>c</sup>) es codificada por un gen cromosomal de copia única, altamente conservado, y que se ha descrito en más de 13 especies de mamíferos (Gasset y Westaway, 2001). Este gen ha sido identificado en el cromosoma 20 en el hombre y en el cromosoma 2 en el ratón, descubriéndose además, que existe analogía en los genes de aves, reptiles y anfibios (Liberski y Jaskólski, 2002). La PrP<sup>c</sup> corresponde a una proteína de membrana doblemente glicosilada en los aminoácidos Asparagina 180 y 196 (Rey-Gayo y Calbo, 2002) y puede existir como una isoforma deglicosilada, monoglicosilada o diglicosilada, con distintas movilidades electroforéticas (Liberski y

Jaskólski, 2002) en el rango de peso molecular entre los 15 y 34 kDa (Katz *et al.*, 1992). Además, está fijada en la superficie externa de las células por un glicofosfatidil inositol (GPI), proceso durante el cual pierde los últimos 20 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal (DeArmond y Prusiner, 1995; Rey-Gayo y Calbo, 2002). El GPI es anclado al residuo Serina 231 a través de una fosfoetanolamina (Lasmezas, 2003).

La estructura secundaria de la PrPc fue resuelta por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) desde los aminoácidos 121 a 231, forma que ahora es denominada la “estructura núcleo o central” de la PrPc. Con esto se demostró que la región N- terminal de la PrPc no presentaba estructura definida y ahora es referida como una “fila flexible” (Lasmezas, 2003).

El hecho que demostró la necesidad de la presencia de la isoforma celular para la producción de la proteína infectiva, es la resistencia de los ratones *Knock out* (ratones que no expresan la PrPc al ser inactivado genéticamente su gen) tras la inoculación intracerebral de PrPsc. Además, en estos ratones se puede restablecer la susceptibilidad a los priones murinos, reinsertando en su genoma el gen de la proteína del prión (Castilla *et al.*, 2002; Dormont, 2002; Brun *et al.*, 2003).

La PrPc al enfrentarse a una proteína patológica, sufre un cambio conformacional post-traducciona que la convierte en PrPsc, sin modificación de su estructura primaria. Este cambio consiste en la adquisición de un mayor porcentaje de conformación  $\beta$  laminar. Así, la PrPc presenta una estructura que contiene un 3% de  $\beta$  laminar y un 42% de  $\alpha$  hélices, mientras que la PrPsc tiene una estructura con un 43% de conformación  $\beta$  laminar y un 30% de  $\alpha$  hélices. La PrP 27-30 posee un mayor porcentaje  $\beta$  laminar, alcanzando un 54% y un menor contenido  $\alpha$  hélices, sólo un 21% (DeArmond y Prusiner, 1995).

Con respecto a la expresión del gen de la PrPc, ésta ocurre constitutivamente en tejidos neuronales y no neuronales de animales adultos, detectándose los niveles más altos en las neuronas (Gasset y Westaway, 2001). En las células no neuronales y en líneas de cultivos celulares, la PrPc, generalmente, se encuentra en la membrana celular. Hay algunas

excepciones como en el estómago, donde la PrPc se ubica en gránulos de secreción de las células epiteliales. En las células neuronales, la PrPc está presente en los nervios terminales presinápticos (Lasmezas, 2003). Los niveles más altos de la PrPc se encuentran en cerebro, particularmente en el hipocampo, existiendo además, niveles significativos en corazón y músculo esquelético y más bajos en la mayoría de los órganos restantes, excepto en hígado y en páncreas (Gasset y Westaway, 2001).

El hecho que la PrPc no se encuentre solamente en las membranas celulares, sino que también en las vesículas sinápticas podría sugerir que la proteína juega un rol en el reciclaje de vesículas o bien un rol más directo en la transmisión sináptica (Lasmezas, 2003). Su localización en la superficie celular podría ser consistente con roles de adhesión y reconocimiento celular o presentar alguna función de receptor de señales transmembranas (Harris, 1999). En roedores infectados experimentalmente con scrapie, se demostró un claro daño en el sistema de neurotransmisores catecolaminérgicos. Esto sugiere que puede existir una clara relación entre los niveles de expresión de PrPc y el metabolismo de los neurotransmisores (Hur *et al.*, 2002).

También se ha sugerido que la PrPc puede jugar un importante rol de actividad protectora antioxidante. Las líneas celulares de ratones *knock out* son más susceptibles al stress oxidativo y a la muerte celular, lo que fue revertido al restablecer la expresión de la PrPc. Por lo tanto, el daño mitocondrial y el incremento en el stress oxidativo pueden ser clave en la patogénesis de las EET (Hur *et al.*, 2002).

El hecho que la PrPc una cobre con una afinidad altamente relevante, sugiere que la proteína podría regular la concentración de este ión en la región sináptica de las neuronas. Además, la PrPc ha mostrado tener actividad de una enzima superóxido dismutasa dependiente de cobre. Por otra parte, diversos experimentos sugieren que la PrPc podría jugar un rol principal en la supervivencia de las células, ya que la proteína se puede unir al anti-apoptótico factor Bcl2 e inducir señales neuroprotectoras (Lasmezas, 2003).



El metabolismo celular de la PrPc se ha determinado mediante estudios de translocación *in vitro*, los cuales han identificado tres formas topológicas de la proteína: una forma de secreción (coincidente con la anclada por el GPI) y dos formas transmembranas que difieren en su orientación (el N-terminal luminal y el C-terminal luminal). La forma de secreción es transportada en vesículas de secreción a la superficie exterior celular donde queda anclada a través del GPI en dominios particulares. Una vez allí, algunas moléculas son liberadas al espacio extracelular por escisión del GPI, mientras que la mayoría son internalizadas en el compartimiento endocítico. Estas últimas pueden ser recicladas hacia la superficie celular, o bien sufrir una ruptura proteolítica en la mitad del N-terminal, cuyos productos son expulsados al extracelular. El metabolismo de las formas transmembranas no se conoce con exactitud, pero la acumulación por sobre un umbral de las formas con el C-terminal luminal se correlaciona con la aparición de estados neuropatológicos (Gasset y Westaway, 2001).

Diversos estudios han demostrado que la PrPc es altamente tóxica si se acumula en el citosol. Cuando se produce esta acumulación, puede hacer insuficientes los mecanismos celulares encargados de la degradación de proteínas aberrantes o anómalas e inducir la muerte celular por apoptosis. La acumulación puede facilitarse por la presencia de mutaciones que afectan a la estabilidad de la conformación de la PrPc, como ocurre en los casos de EET hereditarias, o bien puede facilitarse por la interacción con una PrPsc exógena, en el caso de las infecciones naturales o las inoculaciones experimentales (Castilla *et al.*, 2002).

Se ha demostrado, que la formación de PrPsc ocurre después que la PrPc alcanza la superficie celular y es localizada en dominios similares a caveolas (Prusiner *et al.*, 1998). Además, se ha determinado que la vida media de la PrPc en la superficie es de 5 horas (Dormont, 2002).

La PrPsc es la responsable de la disfunción del Sistema Nervioso Central (SNC) y de la neuropatología de las enfermedades priónicas al acumularse en las neuronas. Hay evidencia sustancial que demuestra que la acumulación precede a la vacuolización y a la

gliosis astrocítica, lesiones que han sido consideradas las características neuropatológicas de estas enfermedades por décadas (DeArmond y Prusiner, 1995). Los mecanismos precisos que culminan con el daño a las células cerebrales es aún desconocido, pero algunos estudios *in vitro* usando cultivos primarios de neuronas han revelado, en parte, la complejidad del mecanismo principal que lleva a la muerte neuronal (Lasmezas, 2003). Estudios del metabolismo del calcio han demostrado que el péptido 106-126 de la PrPsc dirige la regulación de los niveles de calcio intracelular. Debido a que el aumento en los niveles de calcio en la mitocondria es una de las características de la necrosis celular, la observación de la alteración en el metabolismo de este ión en las EET puede ser una fuerte evidencia de la vía necrótica como causa de la muerte neuronal. Sin embargo, hay evidencia que también sugiere la vía apoptótica como causa de la muerte celular. Los niveles de expresión de la proteína Bcl2 (proteína antiapoptótica) y de Bax (proteína inductora de apoptosis) son alterados durante la infección con la PrPsc. El nivel de la proteína Bax aumenta significativamente, mientras que la proteína Bcl2 reduce su expresión, lo que induciría, finalmente, la apoptosis celular. De este modo, estos hechos sugieren que ambas vías, necrosis y apoptosis, pueden jugar un rol en la muerte neuronal (Hur *et al.*, 2002).

Se han utilizado diversos modelos peptídicos que abarcan la región de la PrPc (residuos 106-126) para estudiar la neurotoxicidad de la PrPsc. La secuencia de esta región se ha observado altamente conservada en, prácticamente, todos los mamíferos conocidos, lo que sugiere la importancia de evitar que una mutación sea introducida en esa secuencia, ya sea para preservar la función de la PrPc o para prevenir consecuencias patológicas (Brown, 2000). Los cultivos celulares requieren la expresión de la PrPc y la presencia de la microglía activada para manifestar su efecto tóxico (Brown, 2000; Lasmezas, 2003). La PrPsc 106-126 causa una reducción en la resistencia de las células neuronales al stress oxidativo, posiblemente a través de la inhibición de la incorporación de cobre a la superóxido dismutasa (Brown, 2000). Estos mecanismos de muerte neuronal son, probablemente, no exclusivos y reflejan la diversidad de las enfermedades pertenecientes al grupo de las EET, algunas de las cuales envuelven infección exógena, mientras otras son

gatilladas por mutación de la PrPc, adquiriendo una topología anormal en la membrana celular (Lasmezas, 2003).

Las moléculas de PrPsc, al agregarse, forman placas amiloides (DeArmond y Prusiner, 1995). Este proceso podría ser asistido por una chaperona molecular u otro factor desconocido del huésped, referido como un factor o proteína X (Prusiner *et al.*, 1998; Lasmezas, 2003) que interactúa en una vía especie específica con el C-terminal de la PrPc durante la propagación priónica. Si estas chaperonas también fueran célula-específica, esto podría explicar la propagación selectiva de los priones en distintas poblaciones neuronales y en tipos particulares de células periféricas, como las del sistema linforeticular (Harris, 1999).

La multiplicación de la infectividad de los priones es un proceso exponencial. Una molécula de PrPsc puede combinarse con una molécula de PrPc para producir un heterodímero, que es subsecuentemente transformado a dos moléculas de PrPsc. En el siguiente ciclo, estas dos moléculas combinadas con otras dos PrPc dan origen a cuatro moléculas de PrPsc, prosiguiendo el ciclo de propagación (Prusiner, 1991).

Los factores que condicionan la tasa de formación de PrPsc y los tiempos de incubación de la enfermedad son los siguientes:

- La concentración de PrPsc, que es inversamente proporcional a la longitud del período de incubación.
- La secuencia de ambas isoformas de PrP, ya que cuando las secuencias de las dos isoformas son idénticas, el tiempo de incubación es menor.
- La cepa o tipo de conformación de la PrPsc, ya que algunas cepas de priones exhiben un mayor tiempo de incubación que otras, lo que aún no ha podido ser explicado (Prusiner *et al.*, 1998).

La secuencia aminoacídica primaria de la PrPc es la determinante principal de la barrera interespecie del prión (Glatzel y Aguzzi, 2000). La transmisión de priones entre distintas especies es un proceso estocástico, y en el caso de ocurrir, este proceso es muy

poco eficaz y sucede con una prolongación del tiempo de incubación, que tras pases subsiguientes o adaptación, se acorta y estabiliza, por lo que la transmisión deja de ser un proceso probabilístico. Los priones sintetizados nuevamente reflejan la secuencia del gen de la PrPc del huésped (PrP endógena) (Gasset y Westaway, 2001; Torres *et al.*, 2001).

Otro aspecto importante de destacar, respecto a la proteína priónica patógena, es el descubrimiento de la existencia de distintas cepas de PrPsc o variedades de ella, las que han sido definidas de acuerdo con las características de sus bandas o patrones de glicosilación, por la distribución anatómica de la vacuolización neuronal que producen o por el tiempo de incubación que se observa en el huésped afectado (Prusiner *et al.*, 1998).

### **Patogenia.**

La vía natural de infección de las enfermedades priónicas es la vía oral. Esta ruta de infección es epidemiológicamente muy relevante porque sería la responsable de la epidemia de la BSE y de la transmisión de esta enfermedad a una variedad de especies, incluyendo a los humanos (Glatzel y Aguzzi, 2000).

En modelos experimentales, se ha podido determinar que la vía más efectiva para la contaminación con PrPsc exógena es la vía intracerebral y que la menos efectiva es la vía oral (1 unidad infecciosa intracerebral equivale a 125.000 unidades infecciosas orales). Sin embargo, en la infección natural con la PrPsc, especialmente en el caso de la BSE, se ha determinado que puede ser más infecciosa la vía periférica de contaminación (que incluye la vía oral) que la vía intracerebral (Dormont, 2002).

Una de las principales características de estas patologías, en cualquiera de las especies afectadas, es el largo período de incubación. Esto se podría explicar por la multiplicación de los priones en los tejidos llamados “reservorios”. Muchos estudios apuntan a la importancia de la replicación de los priones en órganos linfoides precediendo a la multiplicación en el SNC, aunque la vía de infección sea la intracerebral (Brun *et al.*, 2003; Glatzel *et al.*, 2003). La presencia del agente causante de estas patologías en el

cerebro, tras la administración oral o periférica de PrPsc, implica que las vías de neuroinvasión deben ser aquellas que inervan los tejidos extraneuronales donde los niveles de expresión de PrPc permitan su transformación y acumulación (Brun *et al.*, 2003). En el caso de una ingestión por vía oral, parece ser clara la implicancia de los plexos mesentéricos y submucosos del tracto intestinal, los que se encuentran próximos a órganos del sistema linforetico asociado al tracto digestivo, como las Placas de Peyer intestinales y nódulos linfoides mesentéricos (Glatzel y Aguzzi, 2000; Brun *et al.*, 2003). En los ratones inoculados oralmente con priones de scrapie o de BSE, estos órganos constituyen los sitios iniciales de replicación (Brun *et al.*, 2003).

Los tiempos de incubación tras la inoculación del agente del scrapie en ratones esplenectomizados o con asplenia genética, son más largos que en ratones normales. En el caso de la infección natural del scrapie, se ha detectado la presencia de PrPsc en el bazo, a diferencia de lo que ocurre en los bovinos afectados naturalmente con BSE, en que no se ha detectado la acumulación esplénica de PrPsc. Sin embargo, ha sido evidente la presencia de PrPsc en modelos experimentales animales, que incluyen roedores y ovinos infectados con BSE (Weissman *et al.*, 2002; Brun *et al.*, 2003; Huang y MacPherson, 2004). Tanto en el caso de la CJD esporádica, como en el de la BSE, la replicación parece estar más restringida al tejido nervioso, por lo que la implicancia de los tejidos linfoides en la patogénesis de las EET parece estar en función del tipo de prión o de la especie hospedadora. La presencia de la proteína resistente a la digestión con proteasas (PrPsc) en el tejido linfoide se ha constatado en la transmisión experimental de la BSE en ovejas y en prosimios. En el hombre, la presencia de PrPsc en el tejido linfoide se ha asociado, únicamente, con la nvCJD. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha podido demostrar la implicancia de los tejidos linfoides en la patogénesis natural de la BSE, pese a la relación causal entre ambas patologías (Weissman *et al.*, 2002; Brun *et al.*, 2003).

El análisis de la infectividad de diferentes órganos en animales infectados experimentalmente, y escogidos en distintos puntos de tiempo post-infección, ha mostrado que la neuroinvasión ocurre cerca de la mitad del período de incubación (Lasmezas, 2003).

Los primeros cambios patológicos como espongiosis y la replicación del agente aparecen en el centro de la médula espinal torácica, al mismo nivel donde los nervios del Sistema Nervioso Simpático (SNS) entran a la médula espinal. En estudios posteriores, se descubrió una vía de acceso adicional al SNC, que utiliza nervios del Sistema Nervioso Periférico (SNP) a través del nervio vago, llegando de este modo a la médula oblonga. Esta ruta alternativa ha mostrado tener una gran importancia cuando los animales son infectados por vía oral, por lo que la vía de administración del agente infeccioso parece ser el factor más importante y que determina la ruta preferencial de transporte al SNC (Glatzel y Aguzzi, 2000).

La patogénesis de las EET envuelve complejas interacciones del agente infeccioso con diferentes células blanco y el medio extracelular (Lasmezas, 2003). En un principio, se pensó que la presencia de los linfocitos B (LB) sería crucial para la neuroinvasión de la PrPsc, aunque el modo preciso de acción de estas células no estaba aún dilucidado (Glatzel y Aguzzi, 2000; Huang y MacPherson, 2004). Sin embargo, posteriormente se pudo comprobar que el papel de los LB no estaba relacionado directamente con el nivel de expresión de la PrPc, ni con la neuroinvasión de la PrPsc, ya que se demostró, que en poblaciones de ratones carentes de precursores de LB, a los que se les inoculó LB procedentes de ratones “*Knock out*” donde la expresión génica de PrPc se ha abolido, la neuroinvasión se restablece de la misma forma que lo hacen los roedores con LB que sí expresan PrPc (Brun *et al.*, 2003; Huang y MacPherson, 2004). Un papel más claro de los LB en la patogénesis de las EET podría derivarse de la función de ellos sobre la mantención del estado de maduración de las células dendríticas foliculares (CDF) en los nódulos linfáticos, las placas de Peyer intestinales y los centros germinales del bazo (Wadsworth *et al.*, 1999; Weissman *et al.*, 2002; Brun *et al.*, 2003), ya que esta maduración depende del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) señalizado desde los LB (Wadsworth *et al.*, 1999). La función de las CDF maduras es la de atrapar antígenos no procesados que forman inmunocomplejos de superficie mediante anticuerpos o componentes del complemento. A su vez, las CDF secretan interleucina 6 (IL-6), cuya deficiencia interfiere con el desarrollo de los centros germinales. Diversos estudios han demostrado, que la acumulación de PrPsc requiere la presencia directa de las CDF maduras, pero no directamente de los linfocitos B

o T. A partir de las CDF del bazo, los linfocitos esplénicos podrían acumular priones, pero solamente si portan PrPc en su superficie (Glatzel y Aguzzi, 2000; Brun *et al.*, 2003; Huang y MacPherson, 2004).

En el año 2003, una línea de investigación sugirió que una serie de cofactores celulares pueden ser importantes para la propagación de la PrPsc *in vivo*. Han sido propuestos diversos cofactores, incluyendo los ácidos nucleicos, que son conocidos por interactuar con las moléculas de PrP *in vitro*. Deleault *et al.*, (2003) demostraron el efecto de los ácidos nucleicos en la propagación de la PrPres o PrP 27-30 en homogeneizados cerebrales. Estos demostraron, que la PrPres era amplificada 6 veces después de mezclarla con el homogeneizado de cerebros infectados y sanos. Sin embargo, cuando se destruyó el RNA del homogeneizado, no se detectó tal amplificación. De esta forma, al adicionar altas concentraciones de RNA exógeno (extraído desde hámster no infectados), la amplificación se elevó en 24 veces. Estos resultados sugieren, que una sola hebra de RNA es necesaria para la amplificación de la PrPres. Además, los autores demostraron que la actividad del RNA muestra especificidad de especie. Sin embargo, este estudio no refuta la hipótesis de la proteína priónica, ya que el RNA puede ser un factor celular del huésped requerido para la conversión de la PrPc en patógena, más que un componente obligatorio o informacional del prión transmisible, ya que ellos demostraron que el RNA activo también está presente en los extractos de tejidos de mamíferos normales, por lo que la presencia de esta molécula es, claramente, no específica de las infecciones de EET (Caughey y Kocisko, 2003).

La BSE ha sido transmitida experimentalmente por vía parenteral a ratones, visones, vacas, cabras y a monos tití y macacos. Por vía oral sólo se han podido infectar vacas, ratones, ovejas, cabras y visones (Castilla *et al.*, 2002; Weissman *et al.*, 2002).

La patología de la BSE es muy parecida a la del Scrapie de la oveja; los cambios más notorios consisten en vacuolización intracelular y del neuropilo, pérdida neuronal, astrogliosis y formación de placas amiloides ocasionales. La ausencia de variación observada en los patrones de vacuolización del tejido encefálico en el ganado afectado, tanto de infecciones naturales, como experimentales, sugiere la posibilidad de que una

única cepa de príon pudiera ser la causante de la epidemia de la BSE, lo que también es apoyado por las características electroforéticas de la PrP 27-30 (Prince *et al.*, 2003). Esto a diferencia de lo que ocurre con las ovejas infectadas con Scrapie, donde se han podido definir 20 cepas distintas de priones (Castilla *et al.*, 2002; Liberski y Jaskólski, 2002). Sin embargo, en el año 2003, fueron reportadas cepas distintas de BSE en Italia y Japón con un test de diagnóstico rutinario (Western Blot). Esta técnica mostró bandas de glicosilación distintas a la convencional de la BSE. Esto podría ser el resultado de una nueva variante de príon introducida en la alimentación del ganado bovino, o bien una aparición espontánea de ella (Willeroider, 2003). En Enero de 2004, fueron reportados 6 casos atípicos de BSE en Francia, por la aparición de patrones de glicosilación de la PrPsc distintos a los observados clásicamente en esta enfermedad. Estos casos atípicos fueron confirmados mediante la técnica de inmunotransferencia y además, se realizaron análisis genéticos en cada caso, los que permitieron excluir la hipótesis de un polimorfismo del gen codificante de la proteína priónica (O.I.E., 2004).

Los cálculos de la dosis infecciosa (ID) en los tejidos con BSE se han basado, primariamente, en titulaciones realizadas en ratones mediante inoculación parenteral de PrPsc. El resultado final se expresa como ID<sub>50</sub>, es decir, la dosis infecciosa que puede producir la enfermedad clínica en el 50% de los animales desafiados. La exposición oral experimental del ganado, a un *pool* de SNC infectado con BSE ha mostrado, que por esta vía el ganado puede ser infectado con 1 gramo de material infeccioso. Se estimó, que el *pool* de cerebros contiene aproximadamente 103 ID<sub>50</sub>/gramo oral. Sin embargo, últimamente ha sido reportada una transmisión con una dosis oral de 0,1 gramo (Prince *et al.*, 2003).

En la tabla N° 2, se muestra el tiempo en que fue detectada la infectividad en distintos órganos de bovinos desafiados con 100 gramos de material cerebral con BSE (Prince *et al.*, 2003).



**Tabla N°2.** Distribución de la infectividad de BSE en tejidos de bovinos desafiados oralmente con 100 g de material cerebral infectado.

<b>Tejido</b>	<b>Período de tiempo de detección de infectividad</b>
Cerebro: Córtex frontal, médula caudal	32 – 40 meses
Médula espinal: C2-C3, T10-T11, L3-L4	32 – 40 meses
Ganglio Trigémino	32 – 40 meses
Ileon Distal	6 – 14 meses, 18 meses, 36 – 40 meses
Médula Ósea	38 meses

### **Signos Clínicos.**

La edad promedio de presentación es de 5 años de edad, con un rango que va desde los 20 meses hasta los 18 años de edad, y el tiempo de incubación hasta el inicio de los signos clínicos fue estimado en 2,5 a 8 años como mínimo (Collee y Bradley, 1997).

La BSE tiene un inicio insidioso de la enfermedad clínica y usualmente, un curso lento y progresivo. Raramente, un caso se puede presentar con signos agudos y con un rápido deterioro. Los animales afectados presentan signología nerviosa, que usualmente incluye cambios de comportamiento, aprehensión e hiperreactividad. Por ejemplo, las vacas afectadas pueden ser reacias a entrar a la sala de ordeña o pueden patear vigorosamente durante ésta. En las vacas secas especialmente, la incoordinación y debilidad de los miembros pélvicos puede ser la primera característica notificada. Los signos neurológicos predominan en todo el curso clínico de la enfermedad y pueden incluir diversos aspectos de alteración del estatus mental y del comportamiento, anormalidades posturales y de movimiento, con sensaciones aberrantes. Sin embargo, los signos nerviosos más comúnmente reportados son la aprehensión, ataxia de los miembros pélvicos e hiperestesia al tacto y al sonido. Las vacas afectadas pueden estar paradas con la cabeza agachada, el cuello extendido y las orejas dirigidas caudalmente, además de anormalidades del paso que

incluyen balanceo e hipermetría en los miembros traseros. La ataxia puede también afectar a los miembros torácicos, con una avanzada severidad de los signos locomotores y debilidad generalizada, resultando finalmente en caídas que pueden predominar en el cuadro clínico. Reportes de disminución de la rumia, bradicardia y alteración del ritmo cardíaco, aunque no son signos específicos, sugieren un disturbio autonómico en la BSE. Características clínicas generales como pérdida de la condición corporal y reducción de la producción de leche pueden también acompañar la signología nerviosa (O.I.E., 2000). La duración de los signos clínicos antes de la muerte es de 1 a 6 meses. La correlación entre los signos clínicos neurológicos y el diagnóstico histológico positivo de BSE es alto (Torres *et al.*, 2001).

En el comienzo de la enfermedad, los signos pueden ser sutiles, variables e inespecíficos. Algunos signos clínicos tempranos de la BSE pueden mostrarse similares con los signos clínicos nerviosos de una cetosis, hipomagnesemia, hipocalcemia, poliencefalomalacia, encefalopatía hepática, encefalitis por Listeriosis y otras encefalopatías. Los signos sutiles pueden, generalmente, ser exacerbados debido a estrés, como es el caso del transporte (O.I.E., 2000).

### **Epidemiología.**

En Diciembre de 1987, se realizó en el Reino Unido un estudio epidemiológico para investigar las potenciales etiologías que desencadenaron la epidemia de BSE. Aunque las características patológicas de la enfermedad eran similares a las del scrapie, también se examinaron otras posibles causas. Se consideraron los siguientes vehículos potenciales de la PrPsc:

- Vacunas, hormonas y otros productos biológicos.
- Contacto directo o indirecto con ovejas y otros animales.
- Semen bovino importado.
- Alimentos conteniendo productos de origen animal (Prince *et al.*, 2003).

Otras causas potenciales fueron los fenómenos tóxicos resultantes desde el uso de químicos agrícolas, como los herbicidas y pesticidas, u otros productos farmacéuticos, incluyendo preparaciones con organofosforados, piretroides sintéticos y antihelmínticos. El factor genético también fue sometido a investigación. El estudio incluyó 200 rebaños afectados y los resultados, finalmente, eliminaron todas las etiologías y posibles vehículos de infección excepto la alimentación. De esta última, dos posibles vehículos de infección fueron evidentes: las harinas de carne y hueso (HCH) y el sebo. La sugerencia de que las HCH fueron el vehículo primario de la BSE estaba basada inicialmente considerando las propiedades físico-químicas del agente del scrapie, que se distribuye más eficientemente en la fracción proteica de las harinas, que en los lípidos de los sebos. Esto fue también apoyado por la variación geográfica de la incidencia de la enfermedad, que se ajusta más con la distribución geográfica y el manejo de las HCH que con los sebos animales (Prince *et al.*, 2003).

La hipótesis de la alimentación fue reforzada por una serie de características de la epidemia: en el Reino Unido, la BSE había sido predominantemente una enfermedad de presentación en vacas de lechería más que en los rebaños lecheros de carne. En Octubre del 2002, un 61.7% de los rebaños de lechería en el Reino Unido (excluyendo Irlanda del Norte) habían experimentado al menos un caso de BSE, comparado con un 17.1% de los rebaños de carne (Prince *et al.*, 2003). La diferencia en el riesgo entre estos dos tipos de grupos, se explica por el mayor grado de uso del concentrado comercial en vacas de lechería. Además, el riesgo de experimentar un caso de BSE aumenta con el incremento del tamaño del rebaño (Wilesmith, 1994; Prince *et al.*, 2003). Otro aspecto importante a considerar es que los bovinos de lechería viven más tiempo que los bovinos de carne, lo que les permitiría desarrollar clínicamente la enfermedad (Collee y Bradley, 1997).

Para investigar esta hipótesis formalmente, se desarrolló un estudio de caso-control a comienzos de 1988. Los resultados otorgaron una fuerte evidencia que las HCH eran realmente el origen de la infección con el agente de la BSE (Prince *et al.*, 2003).

Estudios de simulación simples revelaron que la exposición efectiva del ganado lechero comenzó súbitamente en los años 1981-1982. Esto también sugirió que la exposición había sido continua, prosiguiendo hasta al menos en los años 1984-1985. Sin embargo, estos estudios no determinaban exactamente la razón de esta exposición, debido a que no podía ser explicada simplemente por la alimentación con harinas de carne y hueso de rumiantes, debido a que no era una reciente innovación. La atención se centró, por lo tanto, en el procesamiento de estas harinas y en los cambios que habían ocurrido en su elaboración durante ese tiempo. De este modo, se evidenciaron dos modificaciones básicas en el procesamiento: una reducción en el uso de solventes hidrocarbonados para la extracción de las grasas, y una mayor eficiencia de energía en los procesos continuos de elaboración. En el año 1988, se realizó un estudio en todas las plantas de producción de estas harinas, para obtener los detalles y posibles consecuencias de estos cambios en el procesamiento. Los resultados indicaron, que el cambio en los procesos continuos de elaboración era improbable que fuese el causante de la efectiva exposición del ganado. Sin embargo, el período en que se redujo el uso de los solventes hidrocarbonados para la extracción fue coincidente con el tiempo estimado de inicio de la exposición (Wilesmith, 1994). Este concentrado proteico había sido incorporado a la alimentación del ganado en la década de 1940. El material crudo era procesado en diferentes sistemas a temperaturas desde 100°C a 150°C por distintos períodos de tiempo. La fracción cruda de proteína contenía hasta un 14% de grasa, lo que era reducido mediante la extracción con solventes hidrocarbonados a 70°C por 8 horas. La fracción, luego de la extracción, contenía menos de 1% de grasa. Los solventes residuales eran extraídos mediante tratamiento de vapor a alta presión. Estos pasos de extracción de grasas mediante el uso de solventes fueron omitidos a fines de la década de 1970 y principios de 1980, debido a que el precio de mercado del sebo disminuyó, por lo que la extracción ya no era rentable. Esta omisión registrada durante 1981-1982 en las plantas de procesamiento inglesas, llevaron a la presentación de los primeros casos de BSE observados entre 1985-1986, debido a que el agente infeccioso ya no fue inactivado (Collee y Bradley, 1997).

## **Origen de la infección.**

Wilesmith *et al.*, en 1991, plantearon una hipótesis respecto al origen de la infección de las HCH. Esta propuso, que la BSE del ganado bovino se originó desde el scrapie de las ovejas. Su teoría estaba basada en los siguientes aspectos:

- Un incremento en el tamaño de la población ovina y por consiguiente, la cantidad de material que había sido procesado.
- Un virtual cese en las prácticas de remoción de cerebros ovinos desde estos animales muertos antes del procesamiento (Wilesmith *et al.*, 1991).

Desde que Wilesmith desarrolló su hipótesis, han surgido dos revisiones adicionales sobre el origen de la BSE. La primera de ellas fue el BSE Inquiry, dirigido por Lord Phillips y publicado en Octubre de 2000. La segunda, fue conducida por un comité de científicos dirigidos por Gabriel Horn en Julio de 2001. Esto despertó una serie de dudas respecto al verdadero origen de la BSE, desarrollándose estudios y debates respecto a las siguientes teorías:

- Wilesmith apunta a que la BSE fue causada por un agente ligado al scrapie desde las ovejas, y que permaneció sin cambios en su expresión fenotípica en el ganado bovino, o bien que sufrió un cambio en el ganado bovino durante el reciclaje del agente.
- Phillips plantea que la BSE fue causada por una mutación genética espontánea en el gen de la PrPc bovina.
- Horn plantea que la BSE se originó desde otras especies de mamíferos infectadas con EET, posiblemente un ungulado africano o un felido, cuyas carcasas fueron procesadas e incorporadas a la alimentación del ganado bovino (Prince *et al.*, 2003).

Wilesmith *et al.*, (1991) al observar la distribución de los casos de BSE, concluyeron que la presentación tuvo características de una epidemia extendida de curso común sin transmisión horizontal, debido a que el agente del scrapie no fue removido en el procesamiento de las harinas de carne y hueso. Otros epidemiólogos creen que los datos también fueron consistentes con un curso desde un origen común, es decir, un nuevo agente

que infectó al ganado y que fue, gradualmente, extendiéndose a través del reciclaje sobre un largo período de tiempo (Wilesmith, 1994).

Phillips planteó la idea del origen de la BSE desde comienzos de 1970, posiblemente, desde una vaca o algún otro animal que desarrolló la enfermedad como consecuencia de una mutación genética. Sin embargo, en la búsqueda de esta conclusión, Phillips fue influenciado por un alto número de factores, incluyendo diferentes interpretaciones de los datos epidemiológicos desde la explicación dada por Wilesmith del origen de la BSE (Prince *et al.*, 2003).

El reporte de Horn plantea que el agente de la BSE no se asemeja a ninguno de los agentes aislados que habían sido identificados en ovejas individuales infectadas con scrapie. Sin embargo, observa que el número de ovejas probadas es pequeño y que el número de cepas de scrapie natural, que pueden estar presentes en la población ovina, es alto, por lo que esta teoría sería la menos probable de demostrar (Prince *et al.*, 2003).

Si bien estas tres revisiones pueden diferir en el peso atribuido a la evidencia científica individual y en la interpretación de algunos de los datos, todos agregan que el origen de la BSE puede que nunca sea conocido certeramente (Prince *et al.*, 2003).

### **Factores de riesgo.**

La O.I.E. ha identificado los siguientes factores de riesgo para la ocurrencia de la BSE:

- Potencial para la introducción y reciclaje del agente de la BSE a través del consumo del ganado de HCH de origen rumiante.
- Importación de HCH o alimentos potencialmente infectados con una EET.
- Importación de animales o embriones potencialmente infectados con una EET.
- Situación epidemiológica concerniente a todas las EET de animales en el país.
- Extensión del conocimiento de la estructura de la población bovina, ovina y caprina en el país o la zona.

- Origen de los desperdicios animales, los parámetros y los métodos en el proceso de producción de alimentos animales (Morley *et al.*, 2003).

Estudios epidemiológicos en Inglaterra, han revelado un alto riesgo para la descendencia nacida en rebaños afectados con BSE de desarrollar casos clínicos de esta enfermedad (O.I.E., 2000; Prince *et al.*, 2003). Eso sí, no ha sido establecido si esto es debido a una verdadera transmisión materna, ya que la evidencia de ella es aún poco clara. Una posible explicación, es que el efecto materno sólo puede contribuir significativamente en la epidemia, cuando el riesgo de la infección desde la exposición al alimento es alto. La influencia de una posible predisposición genética en la descendencia no está totalmente determinada (Prince *et al.*, 2003). No existe evidencia de transmisión horizontal entre ganado infectado con BSE. Estudios de transmisibilidad y epidemiológicos no han revelado evidencia de riesgo desde el semen, leche o embriones (OIE., 2000).

### **Diagnóstico.**

La definición inicial de los casos patológicos de BSE, se basó en los cambios histopatológicos no inflamatorios en el SNC, lo que ha originado la base para la confirmación del diagnóstico clínico de la BSE. El examen histopatológico también permite la confirmación de las características fenotípicas neuropatológicas de la BSE. La característica más prominente es la vacuolización que abarca un cambio esponjiforme en el neuropilo de la materia gris y una o múltiples vacuolas en el pericarion neuronal. La vacuolización es simétrica y está distribuida bilateralmente. La alta frecuencia de ocurrencia de la vacuolización neuroparenquimal en ciertos núcleos anatómicos de la médula oblonga a nivel del óbex, en la epizootia del Reino Unido, ha dado una medida satisfactoria para establecer un diagnóstico en una sola sección de la médula. Sin embargo, la observación de lesiones dudosas en la médula a este nivel, requiere el examen de otras áreas para detectar casos de BSE con lesiones mínimas o con lesiones potencialmente atípicas, y cuando sea necesario, establecer diagnósticos diferenciales. Esta vacuolización se ubica preferentemente en determinados núcleos del tronco encefálico: núcleo dorsal del vago, núcleo del tracto solitario y núcleo dorsal del trigémino, ubicados anatómicamente en

la región del óbex. Estos núcleos se han visto afectados en un 99,65% de los casos diagnosticados como positivos, por lo que esta región es la más importante para el diagnóstico histopatológico de la enfermedad (O.I.E., 2000).

En la tabla N°3, se muestran otras patologías que causan cambios espongiiformes en el cerebro de bovinos (Davis *et al.*, 1991).

**Tabla N° 3.** Enfermedades y condiciones asociadas con cambios espongiiformes en cerebros bovinos (Davis *et al.*, 1991).

<b>Condición</b>	<b>Vacuolización Neuronal</b>	<b>Células gliales</b>	<b>Vacuolización Neuropilo</b>	<b>Sitio</b>
BSE	Sí	Gliosis	Sí	Bilateral y simétrico en materia gris cerebral
Hepatoencefalopatía	No	Edema astrocítico	Sí (edema intramielínico)	Generalizado en materia blanca
Encefalopatía renal	No	Sin cambios	Sí	Materia blanca del sistema reticular
Poliencefalomalacia	No	Astrocitosis reactiva	Rarefacción en unión de materia gris-blanca.	Necrosis laminar cortical.
Toxicidad con hexaclorofeno	No	Sin cambios	Sí (edema intramielínico)	Generalizado en cerebro, médula espinal, nervio óptico.
Autolisis postmortem	Sí	Sin cambios	Sí	Generalizado.



Otros cambios degenerativos no vacuolares no son tan prominentes en la BSE. La astrocitosis es otra característica observada, particularmente en los sitios de cambios vacuolares (O.I.E., 2000).

La interpretación de los cambios vacuolares observados en los cerebros de bovinos debe ser realizada con precaución. Han sido reportadas vacuolas en el pericarion, indistinguibles de las observadas de casos con BSE, en neuronas de los núcleos rojo y oculomotor del cerebro medio como un hallazgo casual en el ganado bovino (Davis *et al.*, 1991; O.I.E., 2000).

La demostración de las fibrillas características de PrPsc, denominadas SAF (fibrillas asociadas a scrapie) por microscopía electrónica en extractos detergentes obtenidos desde médula espinal fresca o congelada, ha sido usada como un método diagnóstico adicional de la BSE, pero no tiene el mismo nivel de sensibilidad o especificidad de los métodos de inmunodiagnóstico (O.I.E., 2000).

La infección con BSE puede ser demostrada experimentalmente por la inoculación de ratones con material infeccioso vía intracerebral o intraperitoneal. Sin embargo, estos bioensayos no son prácticos desde el punto de vista diagnóstico, debido al largo período de incubación de la enfermedad, por lo que su utilización se restringe al campo de la investigación (O.I.E., 2000).

Otro método diagnóstico de la BSE son las técnicas inmunológicas, de mayor sensibilidad diagnóstica, ya que permiten detectar la PrPsc mediante el uso de anticuerpos en la última fase del período de incubación de la enfermedad, y por ende, cuando la signología clínica y el daño neurodegenerativo aún no se ha manifestado. Además, permiten trabajar con tejido cerebral con cierto grado de autólisis. La inmunohistoquímica (IHQ) detecta la acumulación de la PrPsc en el tejido cerebral fijado previamente en formalina o parafina. La electroinmunotransferencia o western blot detecta la PrPsc inmunológicamente desde tejido medular fresco o congelado, caracterizando la proteína priónica patógena según su movilidad electroforética y detectando sus bandas de

glicosilación y de peso molecular. Otra técnica es el enzimoimmunoensayo (ELISA), que también detecta la PrPsc desde tejido fresco o congelado y, que al igual que el Western Blot, ha permitido trabajar con un mayor número de muestras por unidad de tiempo mediante el desarrollo de *kit* comerciales de diagnóstico (O.I.E., 2000).

El Departamento de Protección de Salud del consumidor, perteneciente a la Comisión Europea, realizó en Julio de 1999, una evaluación de distintos *kit* comerciales para el diagnóstico de encefalopatía espongiforme transmisible en bovinos. Se seleccionaron cuatro pruebas para esta evaluación:

- a) E.G. & G. Wallac Ltd., United Kingdom, que corresponde a una prueba de ELISA que utiliza dos anticuerpos monoclonales.
- b) Prionics A.G., Switerland, es una prueba de inmunotransferencia para la detección del fragmento PrPsc resistente a proteasas (PrP 27-30). Utiliza un anticuerpo primario monoclonal (6H4), un anticuerpo secundario policlonal y la señal es detectada por quimioluminiscencia.
- c) Enfer Technology Ltd., Ireland, corresponde a un ELISA quimioluminiscente, que utiliza un anticuerpo primario monoclonal, un secundario policlonal y la detección se realiza mediante quimioluminiscencia.
- d) Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), France, es un ELISA tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales (C.E., 1999).

El análisis de estas pruebas fue realizado de acuerdo a la evaluación de la sensibilidad, que corresponde a la proporción de animales verdaderamente infectados que la prueba detecta como positivos en el ensayo, y de la especificidad, que es la proporción de animales verdaderamente no infectados que la prueba detecta como negativos en el ensayo. Por otra parte, se trabajó con las muestras en duplicado, es decir, dos muestras obtenidas desde el mismo animal. Esto se realizó para fijar la repetibilidad de las pruebas y para indagar la variabilidad de los resultados dependiendo de la localización del sitio de muestreo en el cerebro o en la médula espinal.

En cuanto a la selección de los tejidos positivos y negativos, se utilizó tanto secciones de tejido de Sistema Nervioso Central (SNC) como también homogeneizados de estos tejidos. El tejido cerebral y de médula espinal de bovinos con signos clínicos de BSE fue suministrado por el Laboratorio Central Veterinario de Weybridge, Reino Unido. Estas muestras positivas fueron confirmadas mediante la técnica de histopatología del óbex, sitio blanco de la BSE (núcleos del tracto solitario y núcleo del tracto espinal del nervio trigémino). Por otra parte, las muestras negativas fueron obtenidas en Nueva Zelanda desde bovinos adultos (mayores de 4 años) de distintas razas y confirmadas mediante examen clínico e histopatológico.

El resultado sólo se consideró correcto cuando ambas muestras del duplicado arrojaron el mismo resultado (C.E., 1999).

Los resultados indican que los *kit* b, c y d tienen un excelente potencial para detectar o confirmar la BSE clínica para los propósitos de diagnóstico o para el monitoreo de muertes o sacrificio de los animales, particularmente de aquellos accidentados o enviados para reprocesamiento. La habilidad de las pruebas para detectar pequeñas concentraciones de PrPsc, permitiría la detección de animales infectados antes del desarrollo de los signos clínicos (C.E.; 1999; Moynagh y Schimmel, 1999).

### **Distribución geográfica.**

La BSE se ha presentado en diversos países del mundo, siendo más importante su incidencia en el Reino Unido, involucrando tanto al ganado importado como autóctono. El origen de estos casos es más probablemente debido a la exportación de ganado infectado o harina de carne y hueso contaminada desde países con BSE, incluyendo históricamente al Reino Unido. En la Tabla N° 4, se muestran los casos totales de BSE que se han presentado desde el año 1989 hasta Junio de 2004 (O.I.E., 2004).

**Tabla N°4.** Casos totales de BSE en el mundo (1989- Junio 2004).

<b>País</b>	<b>Casos Totales</b>	<b>País</b>	<b>Casos Totales</b>	<b>País</b>	<b>Casos totales</b>
Alemania	312	Austria	1	Bélgica	125
Canadá	2	Dinamarca	13	Eslovaquia	15
Eslovenia	4	España	430	Finlandia	1
Francia	905	Grecia	1	Irlanda	1400
Israel	1	Italia	117	Japón	11
Liechtenstein	2	Luxemburgo	2	Países Bajos	75
Polonia	15	Portugal	894	Reino Unido	180.231
República Checa	9	Suiza	453		

Los países o territorios que han reportado casos de BSE únicamente en animales importados son tres: Las Islas Malvinas, con 1 caso confirmado en el año 1989, y Omán, con 2 casos positivos confirmados ese mismo año. Últimamente, en Diciembre de 2003, se confirmó 1 caso positivo de BSE en Estados Unidos de América (O.I.E., 2004).

Desde Julio de 1988 en Gran Bretaña y desde Enero de 1989 en Irlanda del Norte, la alimentación de rumiantes con proteína derivada de rumiantes fue prohibida. Posteriormente, esta prohibición fue introducida en otros lugares: en Suiza (Diciembre 1990) y a través de la Unión Europea en Junio de 1994. Desde Abril de 1996, esta prohibición fue extendida en el Reino Unido para toda la alimentación de animales de granja, incluyendo caballos y peces. Como resultado de las medidas de control, la epizootia en el Reino Unido y en otros países del mundo está en declinación (O.I.E., 2000).

### **Salud pública.**

Estudios epidemiológicos pasados no habían encontrado conexión entre la exposición de los humanos al agente causante de las encefalopatías espongiformes de los animales, y la ocurrencia de casos humanos de EET como la enfermedad de CJD. En el

caso del scrapie, hasta el momento no se ha demostrado un riesgo ocupacional o alimentario en el hombre debido a la exposición de productos ovinos infectados, lo que ha sugerido que el agente del scrapie no es un peligro para la salud humana bajo condiciones naturales de exposición. Con respecto a la BSE, se consideraba improbable su transmisión al hombre, debido a que la PrP bovina difiere de la humana en más de 30 posiciones aminoacídicas, lo que hace a la barrera de especie más difícil de atravesar (Prusiner, 1995). Sin embargo, el monitoreo de los casos de CJD en el Reino Unido resultó, en Marzo de 1996, en el anuncio de 10 casos reconocidos de una aparente nueva variante de la esporádica CJD (nvCJD) en ese país. Hasta la fecha, 134 casos de nvCJD han sido reconocidos en el Reino Unido, 6 casos han sido reportados en Francia, 1 en Irlanda, 1 en Italia, 1 en Hong Kong, 1 en Estados Unidos y 1 en Canadá (los tres pacientes reportados fuera de Europa han vivido, mayoritariamente, en el Reino Unido) (Andrews *et al.*, 2003; Lasmezas, 2003).

Collinge *et al.*, demostraron, en 1996, que la enfermedad causada por la BSE o por la nvCJD tienen características moleculares similares entre sí, pero muy distintas a las encontradas en los casos de CJD esporádica (CJDs). Sin embargo, en sus últimos trabajos, se demostró que puede existir una relación entre la BSE y la CJDs, ya que al inocular en una línea de ratones (que expresan el genotipo PrP humano 129MM) material cerebral de vacas infectadas con BSE, algunos roedores mostraron el patrón usual de western blot de la BSE, pero otro grupo exhibió un patrón consistente con la CJDs (Butler, 2002).

La magnitud de la contaminación de los humanos con la BSE, que probablemente ocurrió por la ruta oral, es aún desconocida, pero se han tomado medidas para proteger la salud pública, como son la remoción desde la cadena alimenticia humana de productos bovinos que probablemente contienen el agente infeccioso (cerebro, médula espinal, tonsilas, bazo, timo, linfonódulos e intestino) (Lasmezas, 2003).

Después de la exposición oral con el agente de la BSE, el sistema nervioso entérico de los humanos puede ser uno de los puntos iniciales de entrada de la PrPsc, lo que puede proveer una forma de propagación del agente al SNC, como también un sitio inicial de

generación de la infección. La presencia del receptor de laminina (67 kDa) en la superficie luminal del epitelio intestinal, en aproximadamente el 40% de los humanos infectados con la nvCJD, puede representar un factor de riesgo de susceptibilidad para la infección con la PrPsc, así como también, una posible vía de contaminación iatrogénica mediante procedimientos endoscópicos (Ghosh, 2004).

En el año 2003, mediante una técnica sensible de western blot, se demostró la presencia de priones en los músculos y bazo de pacientes fallecidos por CJDs, lo que plantea un nuevo riesgo de transmisión iatrogénica de CJDs a los humanos, ya que la infección, además, se produciría a través del material quirúrgico contaminado con estos tejidos y no sólo con el SNC, como se pensaba con anterioridad (Glatzel *et al.*, 2003). En el caso de la nvCJD, se detectó la presencia de la PrPsc en los órganos linfoides de los pacientes enfermos (tonsilas, linfonódulos y bazo) en todos los casos reportados (Lasmezas, 2003; Collins *et al.*, 2004). Otras investigaciones sugieren, que existiría un mayor riesgo de transmisión secundaria con la nvCJD, ya que mediante un estudio de inmunodetección de PrPsc en pacientes con nvCJD, se reportó la presencia del agente en retina y nervio óptico, en cantidades que corresponden a un 25% de lo que se encuentra en cerebro. Además, se detectaron menores concentraciones en el recto, timo y glándulas adrenales en uno de los pacientes estudiados, lo que sugiere que la PrPsc podría estar presente en otros órganos, además de los descritos hasta la fecha (Collins *et al.*, 2004).

A fines del año 2003, se presentó el primer caso de muerte de un paciente con nvCJD, que había recibido transfusión de sangre desde un dador fallecido a causa de esta enfermedad, en 1999. Esto plantea la posibilidad de transmisión del agente infeccioso por vía sanguínea entre humanos afectados con nvCJD, aunque no hay estudios, hasta la fecha, que comprueben o refuten esta posibilidad. Este caso de transfusión fue realizado en 1996, previo a la prohibición en Inglaterra de transfundir sangre entera, sin leucodepleción, que fue establecida en el año 1998 (Jones, 2003; Llewelyn *et al.*, 2004).

## **Situación en Chile.**

Desde el inicio del problema de la BSE en Europa, Chile ha adoptado todas las medidas recomendadas por los organismos de referencia internacionales (Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para evitar el riesgo de ingreso de la BSE a nuestro país. Las principales medidas adoptadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) han sido las siguientes:

- En el año 1990 se prohibió la importación al país de animales, productos y subproductos bovinos de riesgo de países con BSE. Los productos prohibidos son los siguientes: bovinos vivos, carne fresca enfriada o congelada, harinas de carne y hueso, alimentos balanceados con harinas de carne y hueso (incluyendo los alimentos para mascotas), cabeza (incluyendo ojos y cráneo), médula espinal, linfonódulos, bazo, tonsilas, timo e ileon distal. No se consideran prohibidos la leche y sus derivados, la lactosa, el semen, las pieles y cueros, las gelatinas y el colágeno preparado con pieles y cueros.
- En 1991, el SAG realizó una evaluación cualitativa de riesgo de BSE en el país, demostrando una baja probabilidad de presentar esta patología en Chile.
- En 1996 se estableció la BSE como una enfermedad de notificación obligatoria para el país, por lo que los médicos veterinarios privados deben notificar los cuadros clínicos compatibles con la BSE al SAG.
- Entre los años 1996 y 1998 se colectaron muestras de cerebro de 1.274 animales (bovinos, ovinos y caprinos) desde todo el país, para realizar diagnóstico histopatológico de las EET, de acuerdo a los procedimientos indicados por la OIE, resultando negativas a Scrapie y BSE, en Chile.
- En el año 2000, se prohibió la formulación, elaboración, distribución, venta y uso de alimentos y suplementos que contengan proteínas de origen rumiante para la alimentación de rumiantes.
- En el año 2001, se normó respecto a la elaboración de las harinas de carne y hueso, cuyas plantas deben incorporar en sus procesos una temperatura de 133°C por 20 minutos mínimo a una presión de 3 bar. Además, se exige el mismo proceso de elaboración para la importación de estas harinas de rumiantes (S.A.G., 2004).

En nuestro país nunca ha sido descrito un caso de BSE, siendo evaluado por la Unión Europea como de riesgo despreciable de presentar un caso de esta enfermedad. Esto lo han determinado estudios en Chile que han sido reconocidos por la Comisión Técnica de la Unión Europea, la que llevó a cabo una evaluación del riesgo geográfico de BSE en Chile, clasificando a nuestro país en un Nivel I, es decir, que es altamente improbable que el agente de BSE esté presente en el país, situación que ha sido reiterada nuevamente en abril de 2003 (S.A.G., 2004).

Como medida sanitaria preventiva se eliminó, mediante sacrificio sanitario, los 64 animales bovinos importados desde Dinamarca en 1998. Además, se ha fortalecido el Programa de Vigilancia Activa y Pasiva y se inició un programa de capacitación de ganaderos, profesionales y técnicos pecuarios, del sector público y privado, sobre esta enfermedad (S.A.G., 2004).

El aumento de países con casos nativos de BSE en Europa, entre el año 2000-2001, ha hecho necesario que en nuestro país se adopten nuevas medidas frente a esta enfermedad. De este modo, en mayo de 2001, se amplió la prohibición de importación de productos con tejidos de riesgo, estableciéndose que sólo podrán internarse al país bovinos y sus productos desde Argentina, Australia, Brasil, Estados Unidos, Nueva Zelandia, Canadá, Paraguay y Uruguay. Esta restricción no será aplicable a los siguientes productos, siempre que cumplan con las exigencias específicas de internación: leche y sus productos bovinos, semen, sebo libre de proteínas, pieles y cueros, gelatina y colágeno preparados, exclusivamente, a partir de pieles y cueros. En mayo de 2003, esta resolución fue nuevamente modificada, ya que en esa fecha se presentó el primer caso nativo de BSE en Canadá, por lo que se suspendió la internación de bovinos y productos de origen bovino desde ese país. Las mismas medidas fueron adoptadas al aparecer, en Diciembre de 2003, el primer caso de BSE en un animal importado, en Estados Unidos (S.A.G., 2004).

Se han implementado nuevas técnicas diagnósticas para la BSE en el Laboratorio Oficial del SAG. Además de la utilización de la técnica de histopatología, se implementó la



técnica de inmunohistoquímica, el año 2001, para la vigilancia activa y pasiva anual de BSE (S.A.G., 2004).

El hecho de permanecer en un nivel de riesgo bajo para esta patología, significa para nuestro país estar preparados, científica y tecnológicamente, para detectar y diagnosticar eficazmente la BSE con técnicas rápidas y certeras, para así, impedir el impacto económico y social que esta enfermedad puede ocasionar. En este sentido se enmarca el objetivo central de esta Memoria de Título, que pretende, entre otros, implementar la inmunotransferencia para detectar el agente etiológico de esta patología.

## **5. OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Detectar y caracterizar proteínas priónicas en óbex de bovinos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Obtener y caracterizar proteínas priónicas purificadas a partir de óbex de bovinos.
- Detectar proteínas priónicas utilizando inmunotransferencia (western blot).
- Implementar un método diagnóstico para la detección de proteínas priónicas.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS.

El procesamiento y análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Virología Pecuaria del Complejo experimental Lo Aguirre, perteneciente al Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG), que cuenta con las medidas de bioseguridad necesarias para trabajar en el diagnóstico de esta patología. El financiamiento de esta Memoria de Título fue compartido entre el Servicio Agrícola y Ganadero y el Centro de Biología y Biotecnología (CBB) del Instituto Milenio de la Universidad de Chile.

Se utilizaron 84 muestras de óbex de bovinos provenientes de mataderos de la Región Metropolitana, las que se obtuvieron de bovinos mayores de 30 meses de edad, sin diferenciar raza ni sexo, tal como lo recomendado por la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E). Estas muestras fueron diagnosticadas previamente como negativas a BSE mediante examen histopatológico, y luego fueron congeladas en envases rotulados a -20°C hasta su utilización.

### - Purificación de proteínas priónicas.

Para la obtención de proteínas priónicas se utilizó el método descrito por Diringer *et al.*, (1997), el cual se realizó en triplicado. Se pesaron 40 g de óbex cada vez, obtenidos aleatoriamente desde tres grupos de muestras, los que fueron homogeneizados (Homogeneizador OMNI International) en una solución de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 con Sarcosyl al 10%. Este fue mantenido a temperatura ambiente por 30 min, para después filtrarlo a través de gasa estéril. El filtrado se centrifugó a 16.000 x g durante 15 min a 4°C (Ultracentrífuga Sorvall Ultra-80). Al sobrenadante obtenido se le adicionaron 16 ml de EDTA (Acido Etilendiaminotetracético) 0,1M pH 7,6. La solución final se repartió en tubos que contenían 1 ml de Sacarosa al 20%, los cuales fueron centrifugados a 145.000 x g durante 90 min a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 5 ml de una solución tampón Tris-HCl (Tris-hidroximetil-aminometano) 20mM pH 8,5 conteniendo Zwittergent al 0,1% (Tris-Zw). Se agregó este mismo tampón detergente en cantidad suficiente hasta obtener 25 ml de volumen final, y se adicionó 1 ml de Sacarosa al 20%. Se centrifugó a 145.000 x g

por 1 h a 4°C, y los pellets resultantes se solubilizaron en 5 ml de agua destilada ajustada a pH 8,5, agrupándose en 2 tubos, los cuales se llevaron a 25 ml finales con la solución tampón Tris-Zw pH 8,5, adicionando, nuevamente, 1 ml de Sacarosa al 20%. Posteriormente, se centrifugó a 145.000 x g por 1 h a 4°C y los pellets obtenidos se resuspendieron en una solución de 6 ml de Tris-HCl, pH 8,5, 10 µl de MgCl<sub>2</sub> 1M (Cloruro de magnesio), 10 µg de RNAasa y 10 µg de Benzonasa. La solución resultante se mantuvo con agitación constante por 14 h a 20°C.

### **Caracterización de las proteínas priónicas purificadas.**

Una vez concluido el proceso de purificación de las proteínas priónicas, se tomó una alícuota de 40 µl desde la solución resultante, con el propósito de caracterizar la proteína priónica celular (PrP<sub>c</sub>) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) 12% con SDS (Dodecilsulfato de sodio) 0,2%, según lo descrito por Laemmli (1970). Para esto, se dividió la muestra en dos partes: una de ella (20 µl) fue sometida a digestión con 2 µl de Proteinasa K (20 µg/ml) por 30 min a 37°C. La otra parte de la muestra no se sometió a digestión enzimática.

Para caracterizar la proteína priónica patógena, se utilizó una muestra de PrP recombinante (PrP<sup>rec</sup>), que fue obtenida y facilitada en el Laboratorio del Dr. Torres del CISA INIA Madrid, España. Se tomaron 20 µl de esta muestra que fue sometida a digestión con 2 µl de Proteinasa K por 30 min a 37°C, y se reservaron otros 20 µl de la proteína recombinante para ser caracterizada sin digestión.

Para la realización de la electroforesis, se utilizó un minigel (PAGE-SDS) de 12 x 15 x 1,5 mm. Las muestras fueron distribuidas de la siguiente forma: en el primer pocillo del gel, se pusieron 3 µl de un estándar de peso molecular (entre 250 a 10 kDa) y en los 4 pocillos siguientes, 10 µl de cada una de las muestras en estudio en el siguiente orden: purificado (PrP<sub>c</sub>) sin digestión, purificado (PrP<sub>c</sub>) incubado con Proteinasa K, PrP<sup>rec</sup> sin digestión y finalmente PrP<sup>rec</sup> incubada con Proteinasa K. Este mismo procedimiento se

repitió en la segunda mitad del gel. La electroforesis se realizó a 120 V por 80 min en una solución de Tris-HCl 25 mM, glicina 375mM y SDS al 10%.

Una vez finalizada la electroforesis, una mitad del gel fue teñido con una solución 0,25% de azul brillante de Coomassie R-250, 50% metanol y 10% ácido acético manteniéndolo durante 30 min, para luego desteñirlo con una solución de metanol al 25% y ácido acético al 7% por 30 min, para finalmente ser fotografiado.

Para lograr una mayor especificidad y sensibilidad en este estudio, se procedió a realizar una inmunotransferencia con la segunda mitad del gel obtenido, según el método descrito por Burnette, (1981) con algunas modificaciones. De este modo, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polividilideno difluoride (PVDF Millipore®), manteniéndolas en una cámara de electrotransferencia a 0,4 A durante 1 h a 4°C en un tampón Tris-HCl 25mM, glicina 375mM pH 8,3 y metanol al 20%. Una vez obtenida la transferencia de las proteínas, la membrana fue bloqueada en leche de bovino descremada al 5% (p/v) disuelta en Tris Buffer Salino (TBS) al 1% pH 7,4 y Tween-20 (polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate) al 0,1% (TBS-T) por 1 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se lavó la membrana en TBS-T 3 veces por 5 minutos cada una, para luego incubarla con un anticuerpo primario monoclonal (6H4 IgG1 ratón anti-PrP) en una dilución de 1:5000 en TBS-T durante 12 h a 4°C en agitación constante. Luego de un lavado de 15 min en TBS-T seguido por 4 ciclos de lavado de 5 min cada uno en TBS-T en agitación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario policlonal (IgG-AP cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa) en una dilución de 1:5000 en TBS-T durante 1 hora a T° ambiente en agitación. Se lavó nuevamente por 15 min en TBS-T seguido por 4 ciclos de lavado de 5 min cada uno y luego se incubó la membrana en oscuridad con 1 ml de ECL® (sustrato de peroxidasa) antes de exponerla por 15-20 seg en una película de rayos X. El revelado se realizó en forma manual, para finalmente fotografiar la placa radiográfica.

- **Detección diagnóstica de proteínas priónicas mediante Inmunotransferencia.**

Para la detección de las proteínas priónicas en forma individual, desde las 84 muestras en estudio de óbex de bovinos provenientes de matadero, se utilizó un *kit* diagnóstico para BSE (Prionics®- Check Western) descrito por Albadalejo, (2000). Este *kit* alcanza su mayor precisión y fiabilidad al registrar, tanto la resistencia a la proteasa, como el peso molecular de la PrP 27-30 (PrPres), que corresponde a la proteína priónica patológica proteasa resistente.

Se pesaron 0,5 g de óbex de cada bovino en estudio, y se homogeneizó (Homogeneizador OMNI International) a 20.000 x g por 1 min a 25°C en 5 ml de tampón de homogeneización (Prionics®). Se pusieron 2 alícuotas de 1 ml de cada homogeneizado en dos placas madre de 84 pocillos cada una, para estudiar las muestras en duplicado.

Se prepararon dos placas de digestión de 84 pocillos, agregando a cada uno de ellos 10 µl de tampón de digestión (Prionics®). Se transfirieron 100 µl del homogeneizado desde la placa madre a la placa de digestión, se les añadió 10 µl de Proteinasa K (20 µg/ml) a cada una de las muestras, y luego se incubó la placa de digestión durante 40 min a 48°C. La digestión se detuvo mediante la aplicación de 10 µl de solución de parada (Pefabloc® SC).

A cada una de las muestras en estudio, se les agregó 100 µl de tampón de muestra, para luego denaturarlas en un bloque térmico (Multi-block Lab-Line®) durante 5 min a 96°C.

Por otra parte, el control positivo (PrP recombinante - Prionics®) fue calentado en un bloque térmico durante 2 min a 65°C. Como control negativo se utilizó una muestra diagnosticada previamente como negativa a BSE mediante histopatología e inmunohistoquímica. Se digirieron 100 µl de esta muestra con 10 µl de Proteinasa K bajo las mismas condiciones que las muestras en estudio, mientras que el resto de la muestra no fue sometida a la digestión enzimática, con el propósito de caracterizar la proteína priónica celular (PrPc).

Con las soluciones obtenidas, se realizó la electroforesis en minigeles de poliacrilamida al 12% con SDS 0,2% (nuPAGE Novex, Invitrogen®), colocando siempre en el primer pocillo 5 µl de la muestra control positivo, en el segundo pocillo 3 µl de un estándar de bajo peso molecular (entre 97 a 14 kDa) y en los 14 pocillos siguientes, 10 µl de cada una de las muestras a estudiar en duplicado, incluyendo 10 µl del control negativo incubado con Proteinasa K y 10 µl del control negativo no sometido a la digestión enzimática. La electroforesis en minigeles se desarrolló a 200V durante 35 min en un tampón de electroforesis al 1% (NuPAGE MOPS-SDS Invitrogen®), para luego realizar la transferencia de las proteínas.

Para la realización de cada inmunotransferencia, se utilizó una cámara húmeda para minigeles (Transphor Amersham®). El soporte lo constituyó una membrana de polividilideno difluoride (PVDF Millipore®) (8 × 4,5 cm, 0,45 µm) que se humedeció en metanol 100% y se equilibró por 15 min en un tampón de transferencia Tris-HCl 25mM, glicina 375mM y metanol al 10%. La cámara de transferencia se llenó con el mismo tampón a 4°C. La membrana se orientó hacia el polo positivo y el gel hacia el negativo, realizándose, así, la transferencia de las proteínas a 75 V por 2 h a 4°C. Para verificar que la transferencia se realizó exitosamente, la membrana se tiñó con Rojo Ponceau S al 0,025% (p/v) disuelto en 0,25% de ácido acético por 2 min y luego se decoloró con TBS-T durante 2 min.

La membrana se incubó en 50 ml de Tampón Bloqueante (PVDF- Prionics®) por 1 h a 25°C, para bloquear los sitios inespecíficos de unión. Se incubó con el anticuerpo primario monoclonal (6H4® IgG1 ratón anti-PrP) en una dilución de 1:5000 en TBS-T, por 12 h a 4°C con agitación constante. Posteriormente se lavó con TBS-T por 3 veces cada una por 5 min. Se incubó con el anticuerpo secundario-AP (IgG-AP cabra anti-ratón, conjugado con fosfatasa alcalina) en una dilución de 1:5000 en TBS-T, por 1 h a 25°C con agitación constante. La membrana se lavó con TBS-T por 5 veces durante 5 min y luego se equilibró con una solución de Tampón de Luminiscencia (Prionics®) (20mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9,8) durante 5 min en agitación constante, para posteriormente incubarla por 5 min a 25°C en una solución de 5 ml de Tampón de Luminiscencia que contenía 50 µl de CDP-

Star® (sustrato de fosfatasa alcalina-Roche®). Finalmente, la señal de luz emitida por el sustrato de quimioluminiscencia fue detectada por una cámara sensitiva y evaluada por un sistema computacional (Epi-Cheme II System®).



## **7. RESULTADOS.**

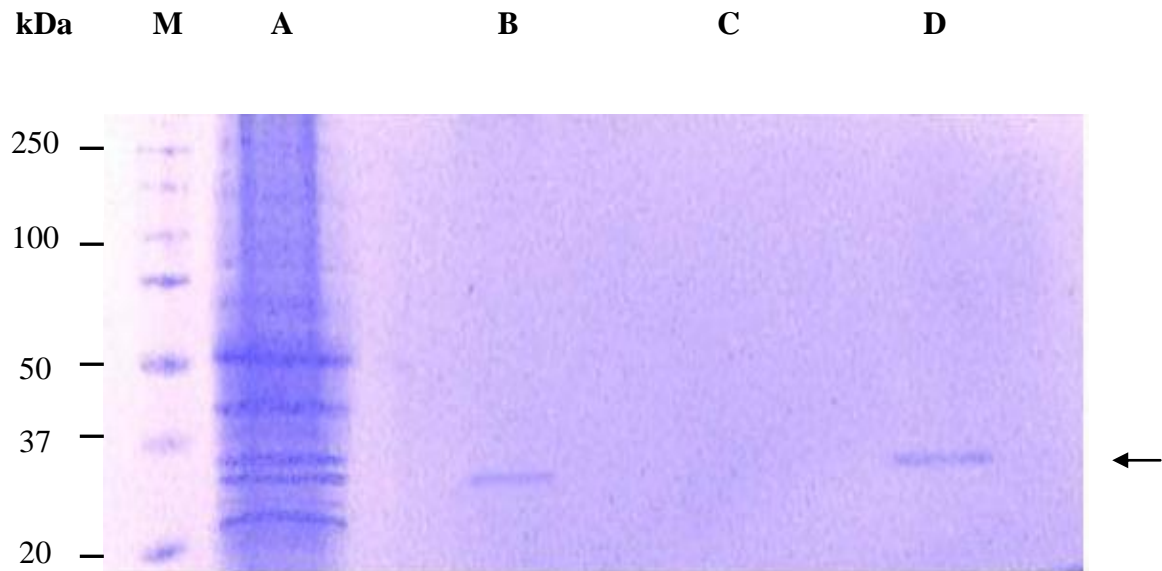
### **- Purificación de Proteínas Priónicas.**

Luego de realizar la obtención de las proteínas priónicas purificadas, se caracterizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y su posterior detección inmunológica se realizó mediante la inmunotransferencia. De acuerdo a esto, se evidenciaron los siguientes resultados:

#### **Caracterización.**

Al someter la primera mitad del gel a tinción con Azul brillante de Coomassie, se pueden evidenciar los siguientes resultados (Fig. N°1): en la línea A se pueden observar diversas proteínas del óbex de bovinos, entre las que se encuentra la proteína priónica celular (PrPc) no sometida a digestión con su peso molecular de 33-35 kDa. Esto a diferencia de lo que ocurre con la misma muestra del purificado luego de su incubación con Proteinasa K, en que sólo se observa una banda correspondiente a la enzima (31 kDa) (línea B).

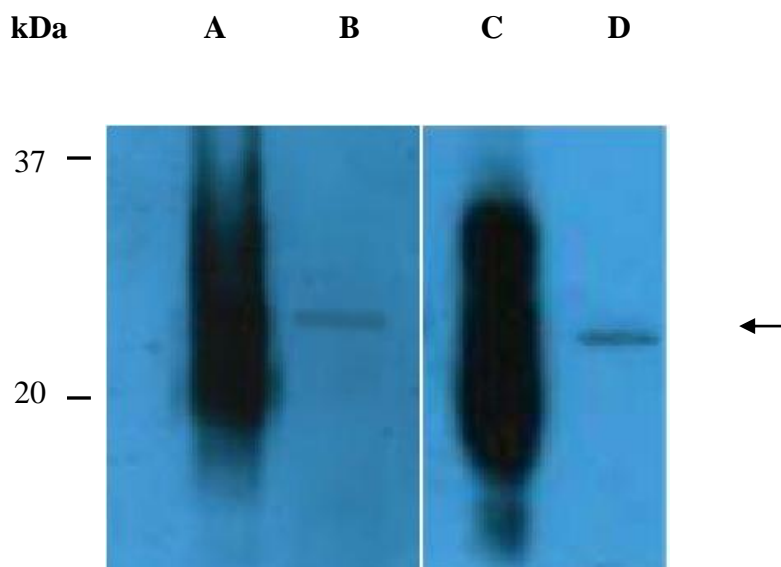
Respecto al comportamiento electroforético de la proteína priónica recombinante (PrPrec), se puede observar que la muestra correspondiente a la PrPrec no incubada con Proteinasa K no se evidencia en el gel (línea C). Por último, la muestra de PrPrec sometida a digestión muestra una banda correspondiente a la enzima (31 kDa) (línea D).



**Fig. N° 1. Electroforesis de proteínas priónicas en PAGE SDS 12%.** (M) marcador de Peso Molecular en kDa, (A) Proteína priónica celular (33-35 kDa), (B) Proteína priónica celular digerida con Proteinasa K, (C) Proteína priónica recombinante (PrPrec), (D) Proteína priónica recombinante (PrPrec) digerida con Proteinasa K. La flecha indica los 31 kDa correspondientes a la Proteinasa K.

Los resultados obtenidos a partir de la inmunotransferencia realizada con la otra mitad del gel se muestran en la Fig N° 2. La proteína priónica celular (PrPc) no sometida a digestión con Proteinasa K fue detectada inmunológicamente por el anticuerpo monoclonal 6H4, observándose la PrPc en su rango de peso molecular entre los 15 a 34 kDa (línea A). Sin embargo, al someter esta proteína purificada a la digestión con Proteinasa K, esta fue destruida completamente, observándose solamente la banda de peso molecular correspondiente a la Proteinasa K (31 kDa) como se observa en la Fig. N°2 (línea B).

Respecto a la proteína priónica recombinante patógena (PrPrec), su detección inmunológica permite observarla con su peso molecular de 33-35 kDa (línea C). Sin embargo, esta proteína al ser sometida a digestión con Proteinasa K, también se destruye completamente (línea D).



**Figura N° 2. Inmunotransferencia de proteínas priónicas.** (A) Proteína priónica celular, (B) Proteína priónica celular digerida con Proteínasa K, (C) Proteína priónica recombinante, (D) Proteína priónica recombinante digerida con Proteínasa K. La flecha indica los 31 kDa que corresponden a la banda de Proteínasa K.

**- Detección diagnóstica de proteínas priónicas mediante inmunotransferencia.**

Los resultados de las muestras de óbex de bovinos procedentes de mataderos de la Región Metropolitana analizadas con este tipo de detección inmunológica, se obtuvieron mediante la utilización de un *Kit* diagnóstico (Prionics®), y se clasificaron de acuerdo a los criterios utilizados por la Comisión Europea y aceptados internacionalmente por la comunidad científica (C.E., 1999). Estos corresponden a la resistencia de la PrPsc a la digestión con Proteínasa K, su detección inmunológica con anticuerpo monoclonal 6H4, y el peso molecular de esta PrP proteasa resistente (27-30 kDa) con sus tres bandas proteicas de glicosilación.

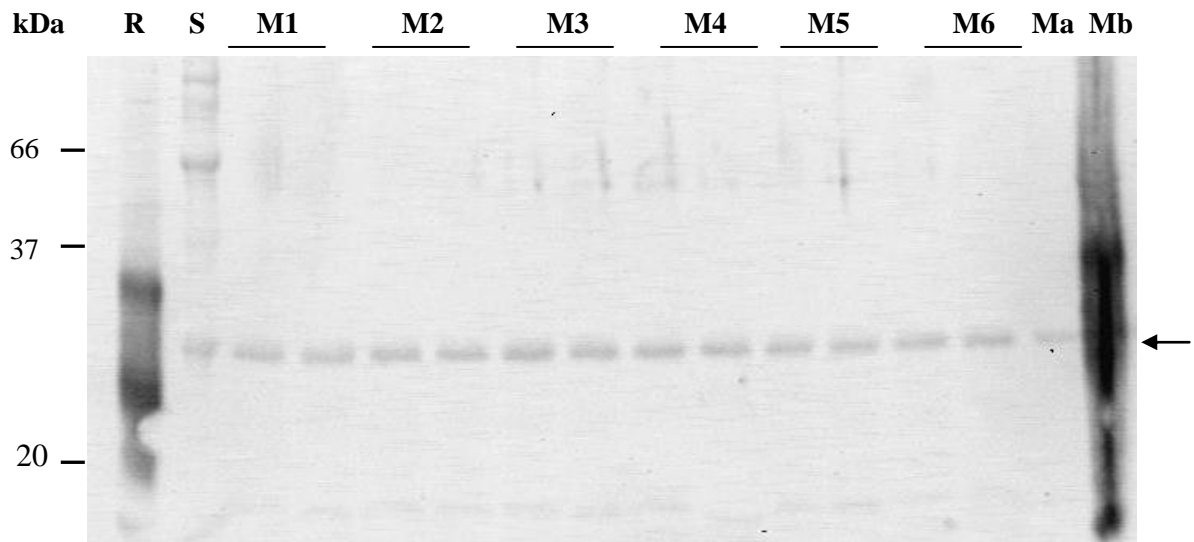
De esta forma, una muestra se considera positiva al identificarse los patrones de peso molecular de la PrPsc proteasa resistente, y la presencia de sus tres bandas características de glicosilación entre los 27-30 kDa.

Por otra parte, el diagnóstico se consideró inconcluso al aparecer bandas en el rango de peso molecular de la PrPsc proteasa resistente (27-30 kDa). En este caso se repitió la prueba, y en el caso de resultar nuevamente inconcluso, la muestra se debería analizar mediante inmunohistoquímica.

El diagnóstico fue considerado negativo cuando no existió señal inmunológica o presencia de bandas entre los 27-30 kDa en ninguno de los duplicados de las muestras en estudio.

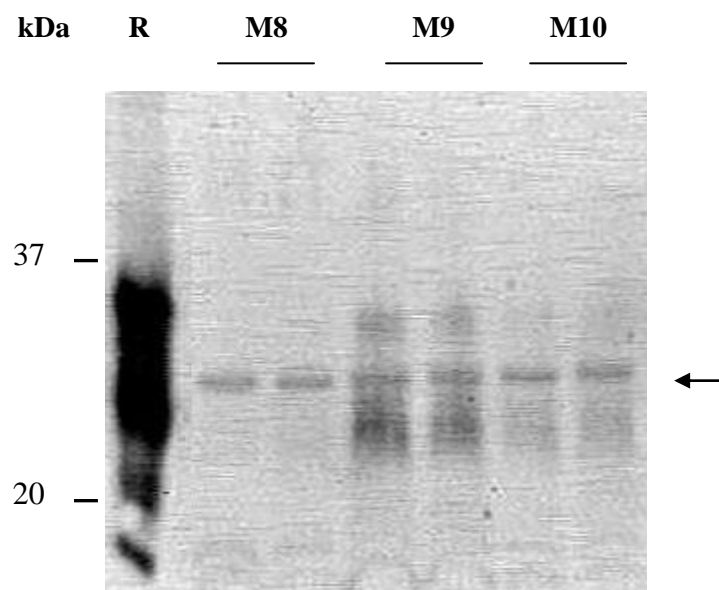
Las muestras fueron analizadas en forma individual comparándolas con el control positivo PrP recombinante (Prionics®) y con la muestra control negativo utilizada.

En la Fig. N°3, se puede observar uno de los western blot desarrollado con 6 de las muestras en estudio, en duplicado, sometidas a digestión con Proteinasa K. Además se aprecia el control positivo (PrPrec), el control negativo que fue sometido a digestión con Proteinasa K (Ma), y el control negativo no sometido a digestión enzimática (Mb) para obtener la detección inmunológica de la proteína priónica celular (PrPc).



**Figura N° 3. Western blot de muestras de óbex de bovinos procesadas por el *Kit Check- Western (Prionics®)*. (R) PrP recombinante (control positivo), (S) estándar de peso molecular (97 a 14 kDa), (M1 a M6) muestras negativas en duplicado, (Ma) control negativo digerido con Proteinasa K, (Mb) control negativo no digerido con Proteinasa K. La flecha indica los 31KDa que corresponden a la banda de la Proteinasa K.**

De las 84 muestras en estudio, 60 arrojaron un resultado negativo según los criterios anteriormente señalados. El resto de las muestras (24) fueron consideradas con un resultado inconcluso, al aparecer bandas en el rango de peso molecular de la PrPres (PrP 27-30). Esto se puede observar en la Figura N°4, donde se aprecian dos muestras en duplicado con resultados inconclusos, ya que aparecen bandas en el rango de peso molecular de la PrPres. Sin embargo, como se puede observar en la figura, estas muestras aparecen también sobre el rango de peso molecular de la Proteinasa K (31kDa).



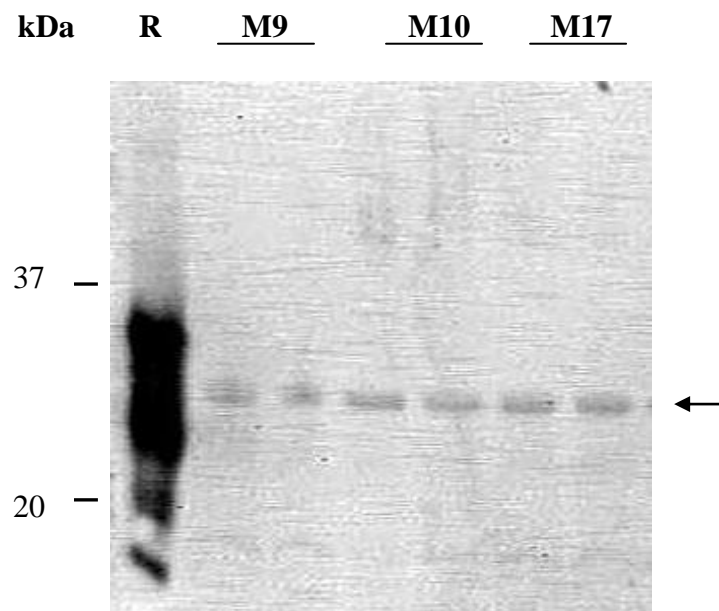
**Figura N°4. Western blot de 3 muestras procesadas con el Kit Check –Western (Prionics®).** (R) PrP recombinante (control positivo), (M8) muestra negativa en duplicado, (M9 y M10) muestras con resultado inconcluso. La flecha indica los 31 kDa que corresponden a la banda de la Proteinasa K.

En la tabla N°4 se observa el resumen de los resultados obtenidos con las 84 muestras de óbex de bovinos estudiadas.

**Tabla N° 4.** Resumen de los resultados obtenidos con el total de las muestras de óbex de bovinos analizadas (n=84).

<b>Muestras</b>	<b>N°</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Positivas	0	0
Inconclusas	24	28,57
Negativas	60	71,43
Total (n)	84	100

Siguiendo los criterios aceptados por la Comisión Europea, se repitió la técnica en las 24 muestras inconclusas, las que se estudiaron nuevamente en duplicado, revelando finalmente un resultado negativo. En la Fig. N°5 se puede observar un western blot de repetición de 3 muestras inconclusas, las que arrojaron un resultado final negativo.



**Figura N°5. Western blot de 3 muestras inconclusas procesadas por segunda vez con el *kit* Check Western (Prionics®).** (R) PrP recombinante (control positivo), (M9, M10 y M17) muestras negativas en duplicado. La flecha indica los 31 kDa correspondiente a la Proteinasa K.

En la tabla N°5 se resumen los resultados obtenidos de la repetición por duplicado de las muestras de óbex que inicialmente se clasificaron como inconclusas.

**Tabla N°5.** Resumen de los resultados obtenidos al repetir el análisis de las muestras consideradas inconclusas inicialmente (n=24).

<b>Muestras</b>	<b>N°</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Positivas	0	0
Inconclusas	0	0
Negativas	24	100
Total (n)	24	100

En la Tabla N°6 se resume el análisis final de las 84 muestras de óbex de bovinos analizadas, en las que todas resultaron negativas según este *kit* diagnóstico de inmunotransferencia (Prionics® Check-Western).

**Tabla N°6.** Resumen final de los resultados obtenidos del total de las muestras de óbex de bovinos analizadas con el *kit* (Check-Western Prionics®) (n=84).

<b>Muestras</b>	<b>N°</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Positivas	0	0
Inconclusas	0	0
Negativas	84	100
Total (n)	84	100



## 8. DISCUSION.

La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) es una enfermedad causada por priones, que ha provocado graves efectos en la economía de los países que la presentan y además, en la salud pública, por su directa relación como agente causal de la nvCJD. Debido a estos hechos, es fundamental el diagnóstico temprano de los casos positivos de BSE, por lo que el desarrollo de métodos rápidos y eficientes de detección del agente etiológico es determinante para una óptima prevención, control y erradicación de la enfermedad.

El agente responsable de causar estas patologías se identificó como una proteína priónica celular del huésped (PrPc) que, tras experimentar un cambio post traduccional, se convierte en una proteína priónica patológica (PrPsc) resistente a proteasas. En una primera parte de este estudio, se utilizó el método de purificación de las proteínas priónicas descrito por Diringer *et al.*, (1997), para posteriormente caracterizar inmunológicamente la proteína priónica celular (PrPc) obtenida de este purificado y la proteína priónica recombinante (PrPrec) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) y posterior inmunotransferencia. Una parte de la fracción resultante de la purificación de la PrPc fue incubada con Proteinasa K, y se pudo comprobar su completa digestión frente a la acción enzimática, mientras que otra alícuota de esta fracción no fue incubada, con el propósito de caracterizarla completamente. Al realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida del purificado de la PrPc no sometido a digestión con Proteinasa K, se pudieron observar distintas proteínas entre los 250 a 20 kDa, y no solamente a la proteína priónica celular (33-35 kDa). Esto implica que el método de purificación utilizado, si bien logró reducir la cantidad de proteínas presentes en la muestra, no consigue aislar sólo a la proteína priónica celular. Esto se puede explicar por el hecho que el método de purificación descrito por Diringer *et al.*, (1997), estaría orientado a la purificación de la proteína priónica patógena (PrPsc), resistente a la Proteinasa K, más que a la proteína priónica celular (PrPc), que no resiste la acción enzimática, con el propósito de reducir la cantidad de proteínas presentes en la muestra del tejido nervioso. Se logra así una digestión más rápida y eficiente de la Proteinasa K sobre el sustrato proteico, obteniendo de este modo sólo a la proteína priónica

infecciosa, que es proteasa resistente. Por este motivo, al observar en el gel de poliacrilamida el purificado sin incubación con Proteinasa K, se aprecia una serie de proteínas constituyentes del óbex de bovinos, dentro de las cuales se encuentra la PrPc, mientras que en el mismo gel, de la muestra del purificado que fue incubada con la enzima sólo se aprecia la banda correspondiente a la proteasa en los 31kDa, lo que indicaría que las demás proteínas presentes en la muestra fueron completamente digeridas. Por otra parte, una alícuota de la proteína priónica patógena recombinante (PrPrec) fue sometida a electroforesis sin previa incubación con Proteinasa K, para lograr su caracterización en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). Sin embargo, esta proteína no se observó en el gel luego de la tinción con azul brillante de Coomasie, lo que difiere del comportamiento electroforético de la proteína priónica patógena natural (PrPsc) que sí se evidencia en los geles de poliacrilamida, tal como fue descrito por Bolton *et al.*, (1982). Esto se debería a la baja concentración de proteína priónica recombinante utilizada, lo que no permite su reconocimiento por la tinción con azul brillante de Coomasie, ya que al ser una proteína de costo de síntesis muy alto, se utilizan bajas concentraciones en el gel, puesto que es específicamente detectable mediante el uso de anticuerpos con la técnica de inmunotransferencia, lo que aumenta la sensibilidad notoriamente. En relación a la fracción de la proteína priónica recombinante (PrPrec), que fue sometida a incubación con Proteinasa K, al igual que lo ocurrido con la PrPc, sólo se puede observar la banda correspondiente a la enzima.

Respecto a la inmunotransferencia realizada con las muestras anteriores, se puede observar que los resultados obtenidos con la PrPc coinciden con los descritos por Bolton *et al.*, (1982), ya que la fracción que contiene a la proteína priónica celular incubada con la Proteinasa K fue digerida completamente, por lo que el anticuerpo primario monoclonal (6H4) no la detectó, a diferencia de lo ocurrido con la PrPc no sometida a esta digestión enzimática, la que fue detectada por el anticuerpo 6H4 y caracterizada por sus bandas de peso molecular entre los 15 y 34 kDa, tal como lo descrito por Katz *et al.*, (1992). Esto demuestra la sensibilidad de la proteína priónica celular frente a la Proteinasa K, tal como ha sido demostrado por distintos investigadores (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner, 1998; Harris, 1999; Liberski y Jaskólski, 2002). Por otra parte, la proteína priónica patógena

recombinante (PrPrec) fue digerida completamente al ser incubada con la Proteinasa K, ya que no fue detectada inmunológicamente, a diferencia de la muestra no sometida a digestión enzimática, que si fue reconocida por la reacción inmuno-específica. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Korth *et al.*, (1997), ya que la proteína priónica recombinante carece de propiedades infecciosas, por lo que no es proteasa resistente, lo cual la hace susceptible a la completa digestión enzimática por parte de la Proteinasa K, tal como ocurre con la proteína priónica celular (PrPc). Esto a diferencia de la proteína priónica infecciosa (PrPsc), que presenta una resistencia parcial a la digestión con Proteinasa K, por lo cual reduce su tamaño a 27-30 kDa producto de la proteólisis limitada de 67 aminoácidos desde su extremo aminoterminal (Torres *et al.*, 2001).

Debido a la epidemia de la BSE en el ganado bovino y a su importante asociación con la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (nvCJD) en humanos (Will, 2002), ha aumentado la necesidad de disponer de un método de diagnóstico rápido y certero para detectar eficientemente la BSE. Si bien la técnica de inmunohistoquímica y la detección de las Fibrillas Asociadas a Scrapie son los métodos diagnósticos de referencia de la BSE, según la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E., 2000), estos requieren de un largo tiempo de procesamiento de las muestras para obtener los resultados. Por otra parte, tal como lo demuestra un estudio realizado por Cooley *et al.*, (2001), la técnica de histopatología sólo permite detectar los casos positivos de BSE cuando la degeneración esponjiforme y los signos clínicos están presentes en el animal, pero no permite detectar el agente causante de la enfermedad en un período pre-clínico, antes de la aparición de los cambios vacuolares en el SNC. Esto ha motivado el desarrollo de pruebas rápidas de diagnóstico basadas en la detección de la proteína priónica patológica (PrPsc) en que, a diferencia de su isoforma celular (PrPc), no se degrada totalmente con la acción de la Proteinasa K, ya que la PrPsc es parcialmente resistente a esta digestión enzimática, quedando sólo su núcleo proteasa resistente denominado PrP 27-30 (Prusiner, 1998; Dormont, 2002). Una de estas pruebas de diagnóstico es la desarrollada por Prionics AG, basada en el método de inmunotransferencia o western blot (Prionics Check-Western®) (Albadalejo, 2000), la que ha sido implementada y utilizada en los países europeos desde el año 1999 para el monitoreo de la BSE y del Scrapie (Schaller *et al.*, 1999). Si bien nuestro

país es considerado internacionalmente por tener un nivel de riesgo mínimo de presentar un caso de BSE (S.A.G., 2004), es necesario estar preparados, tanto científica como tecnológicamente, para realizar monitoreos y programas de control que permitan una detección oportuna y eficaz de esta patología. Para esto, es fundamental la implementación de nuevos métodos de diagnóstico que permitan detectar tempranamente esta enfermedad, y además, analizar una gran cantidad de muestras de animales en un corto período de tiempo.

En el presente estudio, en que se utilizó este *kit* de diagnóstico para BSE (Prionics Check-Western®), se analizaron 84 muestras de óbex de bovino provenientes de matadero de la Región Metropolitana, diagnosticadas previamente como negativas a BSE mediante examen histopatológico. Las muestras fueron procesadas según el protocolo estandarizado por Prionics AG y analizadas según los criterios aceptados por la Comisión Europea el año 1999 (C.E., 1999). Este *kit* utiliza, para la detección inmunológica, un anticuerpo primario monoclonal 6H4 IgG1 que reconoce, tanto a la PrPc, como a la PrPsc (Korth *et al.*, 1997; Albadalejo, 2000).

De las 84 muestras estudiadas en la primera instancia, 60 muestras (71,43%) arrojaron un resultado negativo, ya que al revelar la inmunotransferencia se observó la detección inmunológica de la muestra control positivo (PrP recombinante) por el anticuerpo primario monoclonal 6H4, tal como lo describe Korth *et al.*, (1997), no observándose la presencia de bandas en las muestras estudiadas. Esto demuestra, que la proteína priónica celular (PrPc) fue digerida completamente por la Proteinasa K, por lo que en estas muestras sólo se observa la banda relacionada con esta enzima (31kDa), la que fue detectada por el anticuerpo secundario policlonal, tal como ocurrió con el control negativo sometido a la digestión enzimática. Esto concuerda con lo que describe Schaller *et al.*, (1999) en la validación de este *kit*, en el cual a proteína priónica patógena (PrP 27-30) no está presente en las muestras analizadas, por lo que se consideran negativas a BSE. Por otra parte, el anticuerpo 6H4 reconoció inmunológicamente a la muestra control negativo no sometida con digestión con Proteinasa K, por lo que la PrPc fue caracterizada en su rango de peso molecular de 15 a 34 kDa, tal como lo descrito por Bolton *et al.*, (1982) y Katz *et al.*, (1992).

Sin embargo, 24 de las muestras estudiadas (28,57%) dieron un resultado inconcluso, ya que además de observar la detección inmunológica del control positivo PrP recombinante y la digestión enzimática del control negativo, se observó la presencia de bandas en el rango de peso molecular de la PrP, las que fueron detectadas por el anticuerpo 6H4. Esta situación es considerada por la Comisión Europea como un resultado dudoso o inconcluso, por lo que las muestras deben ser nuevamente procesadas y analizadas (C.E., 1999). En este estudio, esta situación se debería a una digestión enzimática incompleta de la PrPc por la Proteinasa K, por lo que el anticuerpo monoclonal 6H4 detectó la proteína priónica celular mal digerida, observándose así sus bandas en el rango de peso molecular de la PrP. Es importante considerar, que la visualización de las bandas de la proteína correspondían a toda la extensión de peso molecular de la PrPc entre los 15 y 34 kDa y no precisamente a la PrP resistente a proteasas (PrP 27-30), por lo que se podría confirmar más aún una ineficiente digestión enzimática de la proteína celular, más que un resultado positivo. Esto quedó demostrado al repetir nuevamente la digestión enzimática de todas las muestras inconclusas, debido a que en la segunda instancia se logró la digestión completa de la PrPc, por lo cual no aparecieron bandas en su rango de peso molecular, por lo que se diagnosticaron de acuerdo con la C.E., como muestras negativas a BSE, por lo tanto, el total de las muestras analizadas resultaron negativas a BSE.

Resultados inconclusos también se han observado en diversos estudios en los que se ha utilizado esta prueba de diagnóstico. Es así como, en la validación de este *kit* comercial descrito por Schaller *et al.*, (1999), si bien la mayoría de las muestras fueron diagnosticadas correctamente como verdaderos positivos o negativos, los resultados también revelaron muestras inconclusas o falsos positivos. Según el autor, esto se debería a una inadecuada interpretación de los resultados junto con una débil digestión de la Proteinasa K, por lo que se confunde la PrPc mal digerida con la PrP 27-30 patológica, y por lo tanto, un animal sano se diagnostica como falso positivo. Sin embargo, al igual que en nuestro caso, al procesar nuevamente estas muestras inconclusas o dudosas, se logró una óptima digestión enzimática de la PrPc, por lo que finalmente se obtuvo como resultado verdaderos negativos. Este trabajo también arrojó algunas muestras como falsos negativos, atribuidos a un inadecuado tamaño de muestra o bien a una mala localización anatómica de ella. La

sensibilidad fue calculada en un 95,4%, mientras que la especificidad en un 98,9%, resultando ambos parámetros mayores que los obtenidos en la histopatología o en la inmunohistoquímica (Schaller *et al.*, 1999). Similares resultados también se han observado en otros estudios, como el realizado por Cooley *et al.*, (2001) en el Reino Unido, en que se argumentan las mismas razones técnicas, que las mencionadas anteriormente, para explicar los resultados falsos positivos y negativos. Sin embargo, si bien se acepta que la especificidad de la prueba (84,61%) no es tan alta como la sensibilidad (99%), se concluye que es un método de diagnóstico excelente para detectar eficientemente la BSE, ya que sus resultados arrojan una sensibilidad mayor que la obtenida por la detección de SAF o por histopatología (Cooley *et al.*, 2001). Las condiciones en que se realizó el presente estudio, permitieron obtener una especificidad que alcanzó en primera instancia un 77,8%. Esto se podría explicar por mayores errores en la digestión de las muestras, por lo que la PrPc no fue digerida en forma completa y, por lo tanto, fue detectada inmunológicamente, tal como lo explican Schaller *et al.*, (1999) y Cooley *et al.*, (2001). Sin embargo, en este caso no se pudo determinar la sensibilidad de la prueba, puesto que no existieron resultados falsos negativos ni verdaderos positivos, por lo que no se podría calcular la proporción de animales verdaderamente infectados que la prueba detecta como positivos, tal como lo señala la Comisión Europea (C.E.,1999).

Por otra parte, en un estudio comparativo de cuatro *kit* comerciales de diagnóstico de BSE, realizado por la Comisión Europea (1999), la evaluación del *kit* comercial (Prionics Check-Western®) arrojó una sensibilidad y especificidad de un 99,0% y 99,7% respectivamente, lo que es mayor a los dos estudios señalados anteriormente, por lo que este *kit* fue aceptado como óptimo para el diagnóstico de la BSE en Europa (C.E., 1999).

Sin embargo, estos tres estudios mencionados anteriormente no concuerdan con un trabajo realizado por Buschmann *et al.*, (2004), en que se evaluó la eficiencia de cuatro pruebas rápidas de diagnóstico de BSE, pero para Scrapie, entre los que se incluyó al utilizado en esta memoria (Prionics Check-Western®). Estas pruebas están diseñadas para el diagnóstico, tanto de la BSE, como del Scrapie y, si bien el objetivo del estudio se realizó para evaluar la eficiencia de estas pruebas en pequeños rumiantes, los resultados que arrojó

sobre el *kit* rápido de western blot discrepan con los tres trabajos señalados anteriormente y plantean una interrogante respecto a la eficiencia de la detección de la BSE. Buschmann *et al.*, (2004), detectaron casos atípicos de Scrapie en Alemania y en Francia con un *kit* basado en la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA Bio-Rad®). Sin embargo, con los otros tres *kit* de diagnóstico evaluados, entre los que se encuentra Prionics Check-Western®, no se detectaron estos casos positivos. Al modificar los componentes de algunas soluciones tampones incluidas en este *kit*, además de cambiar los anticuerpos y aumentar la concentración utilizada de la Proteinasa K, se lograron detectar eficientemente estos casos positivos (Buschmann *et al.*, 2004). Este estudio confirmaría nuestros resultados respecto a las muestras inconclusas, basadas en la premisa de una mala digestión de las muestras por la proteinasa K.

En un estudio realizado para el diagnóstico de Scrapie en Noruega, por Benestad *et al.*, (2002), se evaluó la eficiencia de las técnicas de histopatología, inmunohistoquímica, western blot (Prionics Check Western®) y ELISA (*kit* comercial Bio-Rad®) para la detección de la PrPsc en un grupo de ovinos con signos clínicos de Scrapie. Tanto el examen histopatológico, como la inmunohistoquímica de los animales afectados, reveló resultados inconclusos en todas las regiones cerebrales estudiadas, mientras que la técnica de ELISA utilizada detectó todos los casos positivos de Scrapie, tal como ocurrió en el estudio de Buschmann *et al.*, (2004). El *kit* de diagnóstico de Prionics Check Western® no detectó todos los casos positivos de Scrapie; sin embargo, al utilizar esta prueba luego de purificar y concentrar la PrPsc, tal como se realiza con el *kit* de ELISA, se logró detectar una glicofoma de PrPsc distinta a las conocidas hasta ese momento para el Scrapie. Por lo tanto, estos resultados concuerdan con los descritos por Buschmann *et al.*, (2004), ya que al modificar o agregar algunos componentes al *kit* de Prionics®, se lograron detectar ciertos tipos de PrPsc de Scrapie que no fueron diagnosticados al utilizar el *kit* tal como se comercializa en el mercado internacional (Benestad *et al.*, 2002).

Sin embargo, una de las ventajas de utilizar la técnica de inmunotransferencia o western blot como método diagnóstico de BSE, es que permite evaluar la presencia de la PrPsc mediante su detección inmunológica, por las características de movilidad

electroforética y las bandas proteicas glicosiladas que esta posee, comparándola con marcadores estándares de peso molecular. Es así como Willeroieder, (2003), reveló mediante un muestreo rutinario de BSE con Prionics Check Western®, la aparición de muestras positivas de BSE en Italia y Japón con un patrón atípico de glicosilación, distinto al tipo IV característico de la BSE. Esto podría indicar la presencia de distintos tipos de priones para el ganado bovino, como ocurre en otras EET, por ejemplo, en el caso del Scrapie en ovinos y caprinos (Willeroieder, 2003). Otra ventaja de este método diagnóstico se puede obtener al compararlo con la técnica de inmunohistoquímica, ya que si bien ambos métodos diagnósticos utilizan la detección inmunológica del agente, la inmunohistoquímica es una técnica que requiere de mayor cantidad de tiempo para obtener los resultados, permitiendo así el procesamiento de una menor cantidad de muestras por cada análisis, a diferencia del Western Blot, que permite analizar un mayor número de animales por unidad de tiempo. Por otra parte, una desventaja de la inmunotransferencia radica en ser un método cualitativo de diagnóstico de BSE, por lo que está sujeto a la interpretación de los resultados según los criterios aceptados internacionalmente, no siendo una determinación cuantitativa del agente causal de la enfermedad. Esto a diferencia de lo que ocurre con los *kit* de diagnóstico de BSE basados en la técnica de ELISA, que entregan los resultados en una menor cantidad de tiempo, junto con una determinación cuantitativa del agente. Cabe destacar, eso sí, que la desventaja de esta última técnica es que la lectura de los resultados no permite discriminar entre la PrPsc o una PrPc mal digerida, ya que los anticuerpos utilizados también reconocen a ambas proteínas. Por lo tanto, si bien la digestión de la PrPc es un paso fundamental para el éxito de ambas técnicas, la inmunotransferencia permite diferenciar la PrPc de la PrPsc mediante la evaluación de su peso molecular. Por otra parte, ya existen dos estudios que revelaron la menor sensibilidad y especificidad del *kit* Prionics Check-Western® para el caso del diagnóstico de scrapie (Benestad *et al.*, 2002; Buschmann *et al.*, 2004), por lo que sería necesario realizar este tipo de estudios con todas las pruebas de diagnóstico de BSE utilizadas actualmente pero en el ganado bovino, para lograr establecer si existen diferencias reales en la detección de ellas. Se debe considerar que este *kit* comercial de diagnóstico fue uno de los primeros en ser elaborado tras la epidemia masiva de BSE en el Reino Unido y, si bien en la actualidad se han desarrollado nuevas alternativas comerciales de diagnóstico para esta enfermedad basados en el



enzimoinmunoensayo (ELISA), hasta la fecha no se ha validado internacionalmente otro *kit* comercial basado en la inmunotransferencia (Western Blot), por lo que aún continúa siendo el único *kit* rápido comercial que utiliza esta técnica como método de diagnóstico de BSE.

En la actualidad, el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile realiza el diagnóstico de la BSE mediante el monitoreo de animales provenientes de matadero de todas las regiones del país, utilizando las técnicas de histopatología e inmunohistoquímica. Si bien esta última técnica es considerada por la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E., 2000) una prueba estándar de diagnóstico de BSE, no permite monitorear en un corto período de tiempo una gran cantidad de animales. Esto último se puede lograr mediante la implementación en nuestro país de las pruebas rápidas de diagnóstico o *kit* comerciales, internacionalmente utilizados y reconocidos para la inmunodetección del agente de la BSE. Esto permitiría un mayor conocimiento sobre el real estatus sanitario de nuestro país respecto a esta patología, ya que se lograría el monitoreo de un mayor porcentaje de animales por unidad de tiempo mediante la utilización de estos métodos rápidos de detección. Además, permitiría a nuestro país alcanzar un nivel científico y tecnológico más avanzado en cuanto al diagnóstico de la BSE, lo que sería fundamental para afianzar las perspectivas exportadoras de carne bovina hacia el mercado exterior, al otorgar un producto que ha sido analizado con técnicas diagnósticas utilizadas, aprobadas y reconocidas internacionalmente.

Al analizar los resultados obtenidos en virtud de lo anterior, se puede desprender que los objetivos generales y específicos de esta memoria de título, como pioneros en aplicar técnicas diagnósticas rápidas para BSE en nuestro país, se cumplieron totalmente, y por ello sus principales conclusiones son las que se enumeran a continuación.

## 9. CONCLUSIONES.

- Se purificó la proteína priónica celular (PrP<sub>c</sub>) obtenida a partir de óbex de bovinos, y se caracterizó comparándola con la proteína priónica recombinante (PrP<sub>rec</sub>).
- Fue posible inmunodetectar las proteínas priónicas mediante la utilización de inmunotransferencia.
- Se consiguió implementar un *kit* comercial de western blot como método de diagnóstico para BSE.
- El total de las muestras de óbex de bovinos analizadas por inmunotransferencia fueron diagnosticadas como negativas para BSE.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

- **ALBADALEJO, J.** 2000. Prionics®- Check. Manual del Kit de ensayo para determinación de la proteína priónica específica de la enfermedad, en Ganado Bovino y Ovino. <<http://www.cultek.com/priones.html>>. [Consulta: 25- 03-2003] 13 pp.
- **ANDREWS, N.; FARRINGTON, C.; WARD, H.; COUSENS, S.; SMITH, P.; MOLESWORTH, A.; KNIGHT, R.; IRONSIDE, J.; WILL, R.** 2003. Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 361: 751-752.
- **BENESTAD, S.; SARRADIN, P.; CHAPLIN, M.; STACK, M.; MOUM, T.; BRATBERG, B.** 2002. Ovine Scrapie- A Challenging diagnosis. International Conference on Transmissible Spongiform Encephalopathies. Edinburgh. 17 pp.
- **BOLTON, D.; MCKINLEY, M.; PRUSINER, S.** 1982. Identification of a Protein that Purified with the Scrapie Prion. *Science* 218: 1309-1311.
- **BROWN, D.** 2000. Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106-126 carrying the Ala 117 – Val mutation. *Biochem. J.* 346: 785-791.
- **BRUCE, M.; WILL, R.; IRONSIDE, J.; McCONNELL, I.; DRUMMOND, D.; SUTTLE, A.; McCARDLE, L.; CHREE, A.; HOPE, J.; BIRKETT, C.; COUSENS, S.; FRASER, H.; BOSTOCK, C.** 1997. Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501.
- **BRUN, A.; CASTILLA, J.; RODRIGUEZ, F.; TORRES, J.** 2003. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las encefalopatías espongiformes transmisibles. *Rev. Neurol.* 37(7): 648-653.
- **BURNETTE, W.N.** 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins. **In:** *Antibodies. A Laboratory Manual.* Eds. Harlow David Lane. United Kingdom. 726 pp. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- **BUSCHMANN, A.; BIACABE, A.; ZIEGLER, U.; BENCSIK, A.; MADEC, J.; EDHARDT, G.; LUHKEN, G.; BARON, T.; GROSCHUP, M.** 2004. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid test. *J. Virol. Meth.* 117: 27-36.
- **BUTLER, D.** 2002. Prion data suggest BSE link to sporadic CJD. *Nature* 420: 450.
- **CASTILLA, J.; BRUN, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; TORRES, J.M.** 2002. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en especies ganaderas y silvestres. *Invest. Agrar. Prod. Sanid. Anim.* 17 (1-2): 1-15.

- **CAUGHEY, B.; KOCISKO, D.** 2003. A nucleic-acid accomplice?. *Nature* 425: 673-674.
- **COLLEE, J.; BRADLEY, R.** 1997. BSE: a decade on-part I. *Lancet* 349: 636-641.
- **COLLINGE, J.** 1999. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 354: 317-323.
- **COLLINGE, J.; SIDLE, K.; MEADS, J.; IRONSIDE, J.; HILL, A.** 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. *Nature* 383: 685-690.
- **COLLINS, S.; LAWSON, V.; MASTERS, C.** 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363: 51-61.
- **COMISIÓN EUROPEA (C.E.).** 1999. The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. Directorate general XXIV. Consumer Policy and Consumer Health Protection. 34pp.
- **COOLEY, W.; CLARK, J.; RYDRE, S.; DAVIS, L.; FARRELY, S.; STACK, M.** 2001. Evaluation of a rapid Western Immunoblotting procedure for the diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in the UK. *J. Comp. Pathol.* 125: 64-70.
- **DAVIS, A.; JENNY, A.; MILLER, L.** 1991. Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 266-271.
- **DEARMOND, S.; PRUSINER, S.** 1995. Etiology and Pathogenesis of Prion Diseases. *Am. J. Pathol.* 146: 785-811.
- **DELEAULT, N.; LUCASSEN, R.; SUPATTAPONE, S.** 2003. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425: 717-720.
- **DIRINGER, H.; BEEKES, M.; OZEL, M.; SIMMON, D.; QUECK, I.; CARDONE, F.; POCCHIARI, M.; IRONSIDE, J.W.** 1997. Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology* 40: 238-246.
- **DOMINGUEZ, A.; MATA, E.; SALLERAS, L.** 1998. Prions and transmissible neurodegenerative diseases. *Med. Clin.* 110: 751-757.
- **DORMONT, D.** 2002. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett.* 529: 17-21.
- **GASSET, M.; WESTAWAY, D.** 2001. Los priones y su biología. <<http://www.svneurologia.org/congreso/priones-1.html>>. [Consulta: 15-04-03] 6 pp.

- **GLATZEL, M.; ABELA, E.; MAISSEN, M.; AGUZZI, A.** 2003. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *New J Med.* 349 : 1812-1820.
- **GLATZEL, M.; AGUZZI, A.** 2000. Peripheral patogénesis of prion diseases. *Microb. Infect.* 2: 613-619.
- **GHOSH, S.** 2004. Mechanism of intestinal entry of infectious prion protein in the pathogenesis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 56: 915-920.
- **HARRIS, D.** 1999. Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(3): 429-444.
- **HILL, A.; DESBRUSLAIS, M.; JOINER, S.; SIDLE, K.; GOWLAND, I.; COLLINGE, J.** 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389: 448-450.
- **HUANG, F.; MACPHERSON, G.** 2004. Dendritics cells and oral transmission of prion diseases. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 56: 901-913.
- **HUR, K.; KIM, J.; CHOI, S.; CHOID, E.; CARP, R.; KIM, Y.** 2002. The pathogenic mechanisms of prion diseases. *Mech. Ageing. Dev.* 123: 1637-1647.
- **JONES, N.** 2003. Blood transfusion linked to mad cow disease death. First UK case of variant CJD from blood. <http://www.nature.com/nsu/031215/031215-14.html> [Consulta: 05-04-2003]. 2 pp.
- **KATZ, J.; PEDERSEN, J.; JENNY, A.; TAYLOR, W.** 1992. Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 447-449.
- **KORTH, C.; STIERLI, B.; STREIT, P.; MOSER, M.; SCHALLER, O.; FISCHER, R.; SCHULZ, W.; KRETZSCHMAR, H.; RAEBER, A.; BRAUN, U.; EHRENSPERGER, F.; HORNEMANN, S.; GLOCKSHUBER, R.; RIEK, R.; BILLETER, M.; WUTHRICH, K.; OESCH, B.** 1997. Prion (PrPsc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390: 74-77.
- **LAEMMLI, U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- **LASMEZAS, C.** 2003. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. Sci. Tech. O.I.E. (Off. Int. Epizoot.)* 22(1): 23-36.
- **LIBERSKI, P.; JASKÓLSKI, M.** 2002. Prion Diseases: a dual view of the prion hypothesis as seen from a distance. *Acta Neurobiol. Exp.* 62: 197-226.

- **LLEWELYN, C.; HEWITT, P.; KNIGHT, R.; AMAR, K.; COUSENS, S.; MACKENZIE, J.; WILL, R.** 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417-421.
- **MOYNAGH, J.; SCHIMMEL, H.** 1999. Test for BSE evaluated. *Nature* 400: 105.
- **MORLEY, R.; CHEN, S.; RHEAULT, N.** 2003. Assessment of the risk factors related to bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech. O.I.E. (Off. Int. Epizoot.)* 22(1): 157-178.
- **OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (O.I.E.).** 2004. Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) worldwide. <<http://www.oie.int>>. [Consulta: 05-06-2004] 3 pp.
- **OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (O.I.E.).** 2000. Scrapie and BSE. **In:** Manual of Standards Diagnostics Test and Vaccines. 4ª edition. O.I.E. París, Francia. 957 pp.
- **PRINCE, M.; BAILEY, J.; BARROWMAN, P.; BISHOP, K.; CAMPBELL, G.; WOOD, J.** 2003. Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech. O.I.E. (Off. Int. Epizoot.)* 22(1): 37-60.
- **PRUSINER, S.; SCOTT, M.; DEARMOND, S.; COHEN, F.** 1998. Prion Protein Biology. *Cell. Press.* 93: 337-348.
- **PRUSINER, S.** 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13363-13383.
- **PRUSINER, S.** 1995. The Prion Diseases. *Sci. Am.* 272(1): 48-57.
- **PRUSINER, S.** 1991. Molecular Biology of Prion Diseases. *Science* 252: 1515-1522.
- **REY-GAYO, A.; CALBO, F.** 2002. Estructura de proteínas: plegamiento y priones. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20: 161-167.
- **SCHALLER, O; FATZER, R.; STACK, M.; CLARK, J.; COOLEY, W.; BIFFIGER, K.; EGLI, S.; DOHERR, M.; VANDEVELDE, M.; HEIM, D.; OESCH, B.; MOSER, M.** 1999. Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPsc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol.* 98: 437-443.
- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (S.A.G.).** 2004. Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE). Situación Actual. <<http://www.sag.gob.cl>> [Consulta: 20-03-2004] 9 pp.
- **TORRES, J.M.; BRUN, A.; CASTILLA, J.; SANCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.** 2001. Las Enfermedades producidas por priones. <<http://www.sanidadanimal.info/priones/priones.htm>> [Consulta: 10-04-2003] 15 pp.

- **TREVITT, C; SINGH, P.** 2003. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: pathology, epidemiology, and public health implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 651-656.
- **WADSWORTH, J.; JACKSON, G.; HILL, A.; COLLINGE, J.** 1999. Molecular biology of prion propagation. *Genes & Dev.* 9: 338-345.
- **WEISSMAN, C.; ENARI, M.; KLOHN, P.; ROSSI, D.; FLECHSIG, E.** 2002. Transmission of prions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 16378-16383.
- **WILESMITH, J.** 1994. Bovine spongiform encephalopathy and related diseases: An epidemiological overview. *New Zealand Vet. J.* 42: 1-8.
- **WILESMITH, J.; RYAN, J.; ATKINSON, M.** 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies of the origin. *Vet. Rec.* 128: 199-203.
- **WILL, R.** 2002. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neurobiol. Exp.* 62: 167-173.
- **WILLERROIDER, M.** 2003. Routine test reveal unknown strains of BSE prions. *Nature* 425: 648.
- **WILLIAMS, E.; MILLER, M.** 2003. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. *Rev. Sci. Tech. O.I.E. (Off. Int. Epizoot.)* 22(1): 145-156.

