



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“DIAGNÓSTICO *POST MORTEM* DE SCRAPIE MEDIANTE  
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EN TEJIDO LINFOIDE DE  
MUCOSA RECTAL EN OVINOS”

**PAOLA ADARY SANHUEZA SALAZAR**

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

PROFESOR GUÍA: DR. GUSTAVO FARIÁS R

Financiamiento: Proyecto FIV N° 121014019102002

SANTIAGO, CHILE  
2010

## ÍNDICE.

<u>RESUMEN.</u>	7
<u>ABSTRACT.</u>	9
<u>INTRODUCCIÓN.</u>	11
<u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</u>	13
<u>Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.</u>	13
<u>Priones.</u>	16
<u>Scrapie.</u>	24
<u>Patogenia del Scrapie.</u>	28
<u>Diagnóstico y detección de la proteína priónica.</u>	33
<u>Lesiones histológicas.</u>	34
<u>Inmunohistoquímica (IHQ).</u>	35
<u>Prueba infección experimental.</u>	36
<u>Westen Blot.</u>	36
<u>Detección de SAF (Fibrillas asociadas a Scrapie).</u>	37
<u>Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).</u>	38
<u>Western immunoblot (WB).</u>	38
<u>Diagnóstico preclínico.</u>	39
<u>Nuevas propuestas para diagnóstico antemortem.</u>	40
<u>Prevención, control y erradicación.</u>	44
<u>Salud pública.</u>	46
<u>Situación nacional.</u>	48
<u>OBJETIVOS.</u>	51
<u>MATERIAL Y MÉTODO.</u>	52
A. <u>Estandarizar la obtención de tejido linforreticular, en muestras de la mucosa rectal de ovinos post mortem.</u>	52
B. <u>Evaluar la aptitud de las muestras, mediante la tinción H/E, en relación a la observación del número necesario de centros germinales para el diagnóstico.</u>	54
C. <u>Detección de la proteína priónica, a través de la técnica de inmunohistoquímica en la mucosa rectal de ovinos.</u>	55

<u>RESULTADOS.</u>	59
<u>Análisis estadístico.</u>	62
<u>Detección de la proteína priónica, a través de la técnica de inmunohistoquímica en la mucosa rectal de ovinos.</u>	64
<u>DISCUSIÓN.</u>	68
<u>CONCLUSIÓN</u>	73
<u>BIBLIOGRAFÍA.</u>	74
<u>ANEXOS.</u>	81

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b><u>TABLA N° 1:</u></b> Enfermedades producidas por priones en el hombre y animales.	13
<b><u>TABLA N° 2:</u></b> Localización del gene PrP, ubicación cromosomal y ortologa de mamíferos <sup>(a)</sup> .	17
<b><u>TABLA N° 3:</u></b> Comparación de la PrP <sup>C</sup> y la PrP <sup>Sc</sup> .	20
<b><u>TABLA N° 4:</u></b> Número de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a distinta distancia desde la línea recto anal.	61
<b><u>TABLA N° 5:</u></b> Comparación de pares de grupos de las distintas distancias de obtención de muestras, mediante la prueba de <i>chi cuadrado</i> ( $\chi^2$ ).	63
<b><u>TABLA N° 6:</u></b> Resumen del número de muestras aptas analizadas por la técnica IHQ aplicada en el tejido linfoide de la mucosa rectal de ovinos.	67

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b><u>FIGURA 1:</u></b> Esquema de la estructura de la PrP.	19
<b><u>FIGURA 2:</u></b> Diferencia conformacional entre la PrP <sup>C</sup> y la PrP <sup>Sc</sup> .	21
<b><u>FIGURA 3:</u></b> Modelo esquemático de la patogénesis del Scrapie en las ovejas.	29
<b><u>FIGURA 4:</u></b> Representación esquemática de las posibles vías para cruzar la barrera epitelial intestinal y la subsiguiente invasión del SNC.	31
<b><u>FIGURA 5:</u></b> Vías neuronales involucradas en la diseminación centripeta del príon desde el intestino hacia el cerebro y la medula espinal después de la infección vía oral.	32
<b><u>FIGURA N° 6:</u></b> Fotografía del recto ovino.	53
<b><u>FIGURA N° 7:</u></b> Microfotografía de un corte histológico de la mucosa de recto ovino, que corresponde a una muestra apta.	59
<b><u>FIGURA N° 8:</u></b> Microfotografía de un corte histológico de la mucosa de recto ovino. En este caso corresponde a una muestra no apta.	60
<b><u>FIGURA N° 9:</u></b> Microfotografía de un corte histológico de la mucosa del recto ovino. Control positivo.	64
<b><u>FIGURA N° 1.0:</u></b> Microfotografía de un corte histológico de óbex ovino. Control positivo.	65
<b><u>FIGURA N° 11:</u></b> Microfotografía de un corte histológico de óbex ovino. Control negativo.	65

**FIGURA N° 12:** Microfotografía de un corte histológico de mucosa rectal de ovino. Corte de las muestras realizadas en este estudio.

66

## ÍNDICE DE GRÁFICOS.

<b><u>GRÁFICO 1:</u></b> Porcentaje de muestras aptas y no aptas del total de 54 individuos.	61
<b><u>GRÁFICO 2:</u></b> Distribución porcentual de las muestras aptas y no aptas a las distintas distancias de la línea recto anal.	62

## **RESUMEN.**

El Scrapie es una enfermedad perteneciente al grupo de las EETs que afecta a ovejas y cabras. Este prototipo de enfermedad priónica, se caracteriza porque en las etapas iniciales de su patogenia el prión se deposita en los tejidos linforreticulares (TLR). Esta cualidad permite que se realicen pruebas diagnósticas preclínicas, en base a la detección de la proteína priónica patológica por medio de Inmunohistoquímica (IHQ) en zonas anatómicas donde es posible reconocer TLR.

Según los informes entregado por la OIE en Chile no se han descritos casos de Scrapie, ni tampoco se posee sistema de vigilancia sobre esta enfermedad., No obstante, se establece que si se llegasen a presentar casos, estos se deben declarar obligatoriamente. Sin embargo, el SAG realiza vigilancia *post mortem* utilizando muestras de óbex con las que se llevan a cabo las técnicas diagnósticas de histopatología, IHQ y ELISA. Debido al potencial ganadero ovino del país, se hace importante poseer herramientas diagnósticas *ante mortem* de fácil realización, que permitan la implementación de programas de control epidemiológico en vivo.

Es así como para esta memoria, se eligió el tejido de la mucosa rectal para validar la técnica diagnóstica por IHQ. Debido a que esta zona anatómica se caracteriza por presentar folículos linfoides dispersos cercanos a la unión recto anal, lo cual la hacen ser un área accesible por medio de una biopsia *in vivo*. A la vez, se realizó un análisis para determinar cual es la mejor región anatómica que permita obtener la mayor cantidad de folículos linfoides, ya que se requieren como mínimo 4 centros foliculares para realizar la técnica de IHQ con valor diagnóstico preclínico de Scrapie, reconocido internacionalmente.

Para alcanzar este objetivo se trabajó con los últimos 4 cm del recto obtenidos de 54 ovinos mayores de 2 años, todos ellos provenientes de mataderos ubicados en la Región de Magallanes y Antártica Chilena. De cada trozo de recto, se analizaron 5 cortes a las distancias de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 cm desde la línea recto anal hacia craneal. Estos cortes fueron sometidos a tinción de H/E, posteriormente se observaron e hizo un conteo de la

presencia de folículos linfoides para así, clasificar la muestra como apta o no para realizar la IHQ. De esta manera, evaluando la aptitud de la muestra se observó que de los 54 individuos, en 33 (61%) al menos una de las cinco muestras fue considerada como apta y en 21 (39%) de ellos, no se presentaron muestras aptas en ninguno de sus cortes.

Una vez obtenido los datos de la cantidad de folículos presentes por corte estos se sometieron a un análisis estadístico de *chi cuadrado* ( $\chi^2$ ), el que arrojó como resultado que la mejor zona para obtener una muestra útil para el diagnóstico, es el área comprendida entre los 0,5 y 1,5 cm desde la unión recto anal.

Así, del total de 270 cortes obtenidos, 74 cortes fueron aptos para realizar la IHQ, correspondiente al 61,1 % de los individuos muestreados. Todos estos cortes fueron negativos a Scrapie al no presentar el precipitado granular rojo de la inmunotinción y al compararlos con controles positivos y negativo que se disponían.

De esta forma, la técnica basada en la biopsia rectal entrega una herramienta potencialmente útil para el diagnóstico precoz del Scrapie, debido a que el tejido linfoides rectal es fácilmente accesible en ovinos vivos, lo que facilita una rápida toma de muestras con un mínimo malestar para el animal. Esta técnica tendrá su mayor efectividad cuando se utilice una biopsia obtenida en la zona comprendida entre los 0,5 y 1,5 cm desde la unión recto anal.

Por lo tanto, con este estudio se logró estandarizar la zona más adecuada para la toma de muestra, por medio de una biopsia rectal *in vivo*, además de validar la técnica de IHQ en estos tejidos, para así utilizarla como posible técnica *in vivo* de *screening* en programas de cuarentena y control de Scrapie para el país.

## **ABSTRACT.**

Scrapie is a disease of the group of TSEs that affects sheep and goats. This prototype of prion disease is characterized because in the early stages of its pathogenesis it prion is placed in lymphoreticular tissues (LRT). This quality allows it to conduct pre-clinical diagnostic tests based on the detection of pathological prion protein by Immunohistochemistry (IHC) in anatomical areas where it is possible to recognize LRT.

According to reports issued by the OIE in Chile, there have not been any described Scrapie cases, neither has a surveillance system for this disease. It is established, however, that if there were any cases, these should be declared as mandatory. However, the SAG performs surveillance using postmortem samples of obex to dig being carried diagnostic techniques of histopathology, immunohistochemistry and ELISA. Because of potential sheep farmer in the country, it is important to have diagnostic tools that are easy to perform and permit the implementation of epidemiological surveillance programs *in vivo*.

This is how the rectal mucosal tissue has been selected in this report to validate the diagnostic technique for IHC, since this anatomic area is characterized by scattered lymphoid follicles near the anal rectal junction, which makes it an accessible area through a biopsy *in vivo*. Along with this, an analysis was performed to determine the best anatomical region that allows to get the greatest number of lymphoid follicles, as they require at least 4 follicular centers to perform the IHC technique with preclinical Scrapie diagnostic value.

In order to reach this goal we worked with the last 4 cm of the rectum obtained from 54 animals over 2 years, all from abattoirs located in Region of Magallanes and Antártica Chilena. 5 cuts from every piece of rectum were taken at distances of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 cm from the anal-rectal line to cranial. These cuts were subjected to staining of H/E, then were observed and did a count of the presence of lymphoid follicles and classify a sample or not suitable for IHC. Thus, evaluating the suitability of the sample showed that of 54 individuals, 33 (61%) at least one of the five samples was considered suitable and in 21 (39%) of them, there were no suitable samples in any of its courts.

After obtaining the data on the number of follicles present in each cut, they were subjected to an analysis under the *chi square* ( $\chi^2$ ) statistic, which returned as a result that the best area to obtain a useful sample for diagnosis is the area between the 0.5 and 1.5 cm from the anal rectal junction.

Thus, from the total of 270 cuts obtained, 74 of them were suitable to perform the IHC, accounting for 61.1% of the sampled individuals. All these cuts were negative for Scrapie for not having the red granular precipitate of immunostaining and comparing them with positive and negative controls were available.

Thereby, the technique based on rectal biopsy provides a potentially useful tool for early diagnosis of Scrapie, because the rectal lymphoid tissue is easily accessible in alive sheep, which facilitates fast sampling with minimum discomfort for the animal. This technique will be most effective when using a sample obtained in the area between 0.5 and 1.5 cm from the anal rectal junction.

Therefore this study was accomplished to standardize the most appropriate zone for sampling via a rectal biopsy *in vivo*, in addition to validating the technique of IHC in these tissues, in order to use it as a possible *in vivo screening* technique in quarantine and control programs of Scrapie along the country.

## **INTRODUCCIÓN.**

El Scrapie, es una enfermedad neurodegenerativa que pertenece al grupo de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), también conocidas como enfermedades producidas por priones. Afecta a ovinos y caprinos, cuyos primeros indicios de aparición se remontan hace más de 250 años en Gran Bretaña y otros países del oeste europeo. El comercio y la exportación del ganado ovino, durante el siglo XIX provocaron su rápida diseminación, lo que ha llevado a que actualmente se describa prácticamente en todo el mundo, con excepción de Australia y Nueva Zelanda. En nuestro país hasta la fecha no se ha descrito la presencia de Scrapie.

El Scrapie se caracteriza por ser una enfermedad de curso lento, cuya sintomatología es principalmente nerviosa y siempre tiene un desenlace fatal. La transmisión de esta enfermedad ocurre de forma vertical (antes o durante el momento del parto) y también por vía horizontal (principalmente oral).

Si bien los signos clínicos hacen sospechar tardíamente de la aparición de esta patología, a raíz de las investigaciones realizadas se ha logrado identificar que, en etapas iniciales la proteína priónica se deposita y acumula en los tejidos linforreticulares, lo que permitiría hacer un diagnóstico preclínico y por lo tanto retirar a estos animales de la línea productiva y reproductiva, con el fin de evitar su diseminación. Este último conocimiento, ha sido aprovechado en el desarrollo de metodologías diagnósticas tempranas, las cuales mediante el uso de la técnica de la inmunohistoquímica (IHQ), pueden ser utilizadas para detectar las acumulaciones de proteína priónica en los linfonódulos, especialmente del tercer párpado y del tejido recto anal, lo que ha permitido la aplicación de técnicas altamente sensibles y específicas como medio de diagnóstico preclínico.

En este estudio, por una parte se pretendió ubicar la mejor zona anatómica donde se evidencien los folículos linfoides en el tejido rectal ovino y por otra, implementar la técnica de IHQ para detectar la proteína priónica alterada en una muestra rectal. Esto con el propósito de entregar las herramientas al país para aplicar un método rápido y no invasivo

de diagnóstico *in vivo*, que a futuro, podría ser utilizado como procedimiento para detectar el Scrapie en vivo. Esto permitiría, por ejemplo lograr establecer medidas de control de animales que estén incubando la enfermedad y que aún no manifiestan los signos clínicos, así como también, sistemas de vigilancia epidemiológica frente a animales provenientes de países en donde se sospecha la presencia de esta enfermedad y que no ha sido comunicado oficialmente.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), también conocidas como enfermedades producidas por priones, son desórdenes neurológicos progresivos con largos períodos de incubación que conducen a espongiosis y pérdida neuronal; el resultado es siempre fatal. Esta neuropatología se asocia a una glicoproteína codificada por el hospedero denominada proteína priónica (PrP), la que se modifica desde su forma celular normal (PrP<sup>C</sup>) a una anormalmente plegada o patológica (PrP<sup>Sc</sup>), caracterizada por ser una isoforma menos soluble (Prusiner, 1995; Aguzzi, 2006; Espenes *et al.*, 2006; Jeffrey y González, 2007; Ryou, 2007).

Las EETs se han reconocido en diversas especies (Tabla 1), es así como se describe el Scrapie en ovejas y cabras; la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) en bovinos; la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) en los gatos; y en los humanos la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), el Insomnio Familiar Fatal (IFF), el Kuru, y el Síndrome de Gerstmann-Sträussler (SGS) (Miller *et al.*, 1993; Prusiner, 1995; Mabbott *et al.*, 1997; Tyler *et al.*, 1999; Fournier y Grigoriev, 2001; Bozzeta *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2004; Lysek *et al.*, 2004; Ryou, 2007).

**TABLA N° 1. Enfermedades producidas por priones en el hombre y animales.**

Nombre (a)	Hospedero	Mecanismo de transmisión	Año reconocido
Kuru	Humano (Papua Nueva Guinea)	Infeccioso; exposición a tejidos contaminados del hombre durante rituales de canibalismo.	1957
sCJD	Humano	Espontáneo; mutación somática o conversión espontánea de PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>Sc</sup> .	1920
fCJD	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1924
iCJD	Humano	Infeccioso; exposición a equipamiento quirúrgico infectado con priones o trasplante de	1974

		tejidos; transfusión sanguínea; terapias con hormona del crecimiento humana.	
vCJD	Humano	Infecciosa; exposición a alimentos infectados con BSE.	1996
SGS	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1936
IFF	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1986
sIF	Humano	Desconocido; espontáneo; mutación somática o conversión espontánea de PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>Sc</sup> .	1997
Scrapie	Ovejas y cabras	Infeccioso; ingestión o contacto directo como animales infectado de Scrapie, tejidos y secreción derivado de animales infectados, o ambiente contaminado; posible exposición oral.	1732
ETV	Visón	Infeccioso; ingestión de alimento contaminado por priones.	1947
EEB	Bovinos	Infeccioso; ingestión de alimento contaminado por priones.	1986
EEF	Gatos, ocelote, gato de oro asiático, tigre, león. Puma y Chita	Infeccioso; ingestión de alimento contaminado por priones.	1990
CWD	Ciervo, Alce, ratón	Desconocido; infeccioso, espontáneo; contacto con o ingestión del prión.	1967
EUS	Kudu, Oryx, Nyala, Eland, Gemsbok. (ungulados salvajes)	Infeccioso; contacto con alimentos con tejidos contaminados con BSE.	1986

(a) sCJD (Enfermedad de Creutzfeld- Jacob esporádica), fCJD (Enfermedad de Creutzfeld- Jacob familiar), iECJ (Enfermedad de Creutzfeld- Jacob iatrogénica), vCJD (Enfermedad de Creutzfeld- Jacob variante), SGS (síndrome de Gersmann´Straussler- Scheinker), IFF (insomnio familiar fatal), sIF (insomnio fatal esporádico), ETV (encefalopatía transmisible del visón), EEB (encefalopatía espongiiforme bovina), EEF (encefalopatía espongiiforme felina), CWD (Enfermedad de la caquexia crónica), EUS (encefalopatía de ungulados salvajes) (Ryou, 2007).

La forma mas común y antigua observada de las EETs corresponde al Scrapie o “Rascadera” de las ovejas y cabras, presente mundialmente desde el siglo XVIII (Miller *et al.*, 1993; Bermejo y Muñoz, 2001). En los años 20 se describió en humanos la CDJ, caracterizada por una demencia peculiar, de evolución subaguda, asociada a síntomas neurológicos motores. En 1957, Vincent Zigas del Servicio de Salud Pública Australiana y Carleton Gajdusek del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos describieron el Kuru de los indígenas Fore de Nueva Guinea, cuyo cuadro clínico afecta preferentemente a mujeres y niños, los que presentaban ataxia, temblor y muerte a los pocos años. Este cuadro clínico se relacionó con los ritos funerarios de canibalismo, costumbre en la cual mujeres y niños solían comer el cerebro de los difuntos y los hombres sus músculos (Prusiner, 1995; Bermejo y Muñoz, 2001; Aguzzi, 2006). Wells y Wilesmith del Laboratorio Central Veterinario en Weybridge, Inglaterra, identificaron la EEB en 1986, después de que unas vacas en Gran Bretaña comenzaran a presentar descoordinación y a estar inusualmente asustadizas. La fuente de esta epidemia emergente, fue localizada en los suplementos alimenticios que incluyeron carne y hueso provenientes de ovejas muertas (Prusiner, 1995). Todas estas enfermedades además de alteraciones del comportamiento, tienen en común el presentar alteraciones morfológicas en el tejido cerebral, dándole un aspecto de “queso suizo” (Prusiner, 1995; Prusiner, 1998; Bermejo y Muñoz, 2001).

Durante muchos años, la causa real de todas estas patologías fue asociada a un concepto de “virus lento” término acuñado en 1954 por Sigurdsson, sin embargo, con el correr de los años este concepto se fue desestimando puesto que había ausencia de inactivación del “virus lento” por los agentes que inactivan a los virus, junto con inexistencia de reacción inflamatoria cerebral. Además, se comprobó que el agente causante de las EETs no contenía material genético en su estructura (ADN o ARN). (Prusiner, 1995; Prusiner, 1998; Bermejo y Muñoz, 2001; Lysek *et al.*, 2004). Es así como, en la década de los `80, Prusiner y colaboradores reconocieron la naturaleza proteica del agente de las EETs e introdujeron el término de “prión” para denominarlo (Prusiner, 1995; Bermejo y Muñoz, 2001).

De este modo, hoy en día se reconoce mundialmente que la causa de estas enfermedades fatales (EETs), es un patógeno proteínaceo denominado prión, el que carece de ácidos nucleicos funcionales (Ryou, 2007).

### **Priones.**

Los priones son pequeñas partículas infecciosas de naturaleza proteica, con sorprendentes propiedades que los hacen más resistentes que la mayoría de las proteínas a la inactivación por métodos físico-químicos. La naturaleza proteica de los priones, se sugirió por su resistencia a la inactivación por procedimientos que destruyen los ácidos nucleicos, como por ejemplo la radiación ultravioleta (Torres *et al.*, 2001).

Estas pequeñas partículas infecciosas son una forma alterada de una proteína estructural de la membrana celular normal PrP<sup>C</sup>, la que es codificada por un gen (PRNP) en el brazo corto del cromosoma y esta abundantemente expresada en las células de mamíferos. Sin embargo, estas dos proteínas priónicas (la forma celular normal y la alterada), tienen propiedades físicas muy diferentes (Katz *et al.*, 1995; Bermejo y Muñoz, 2001, Zomosa-Signoret *et al.*, 2008) y animales enfermos y saludables son normalmente inmunotolerantes a cualquiera de las isoformas de PrP presente en sus tejidos (Katz *et al.*, 1995).

El gen PRNP localizado en el cromosoma 20 (en el humano) y que codifica la proteína PrP<sup>C</sup>, presenta un único exón que codifica todo el marco de lectura abierto y muestra un elevado grado de conservación en las distintas especies. A pesar de esta característica, las partículas infecciosas procedentes de una especie son muy eficaces para transmitir la enfermedad a cualquier hospedero que contenga el gen de la proteína normal de la especie. La eliminación mediante ingeniería genética del gen PRNP en el hospedero, hace que el animal presente resistencia frente a la infección por PrP<sup>Sc</sup> (De Girolami *et al.*, 2000).

Genes ortólogos de PrP han sido revelados en variadas especies animales y su loci cromosomal ha sido determinado en algunas especies (Tabla 2). En los animales, el gen de la PrP se expresa ampliamente, con una alta concentración en las células neuronales del

cerebro, pero no sólo limitada a estas. Dentro de la célula, la PrP<sup>C</sup> es sintetizada en el citoplasma, transportada a través del retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi, para ser expuesto en la membrana plasmática. En las células neuronales, la PrP esta concentrada en dominios de la membrana plasmática muy ricos en lípidos, conocidos como dominio semejantes a caveolin. La fracción proteica localizada en la matriz extracelular se ancla a la membrana plasmática por una cadena de glicosilfosfatidilinositol (Ryou, 2007).

**TABLA N° 2. Localización del gene PrP, ubicación cromosomal y ortóloga de mamíferos<sup>(a)</sup>.**

<b>Especie</b>	<b>Símbolo del locus</b>	<b>Cromosoma</b>
Humano	PRNP	20p12.17
Chimpancé	PRNP	20
Bovino	PRNP	13q17
Oveja	PRNP	13q17 - 13q18
cabra	PRNP	13q15
Búfalo de agua	PRNP	14q15
Zorro plateado	PRNP	14
Gato	PRNP	A3
Perro	PRNP	24
Visón	PRNP	11
Conejo (europeo)	PRN-P	NR
Rata	Prnp	3q36
Hamster Chino	PRNP	NR
Hamster sirio	PRN-p	NR
Ratón	Prnp	2 (75.2 cM)

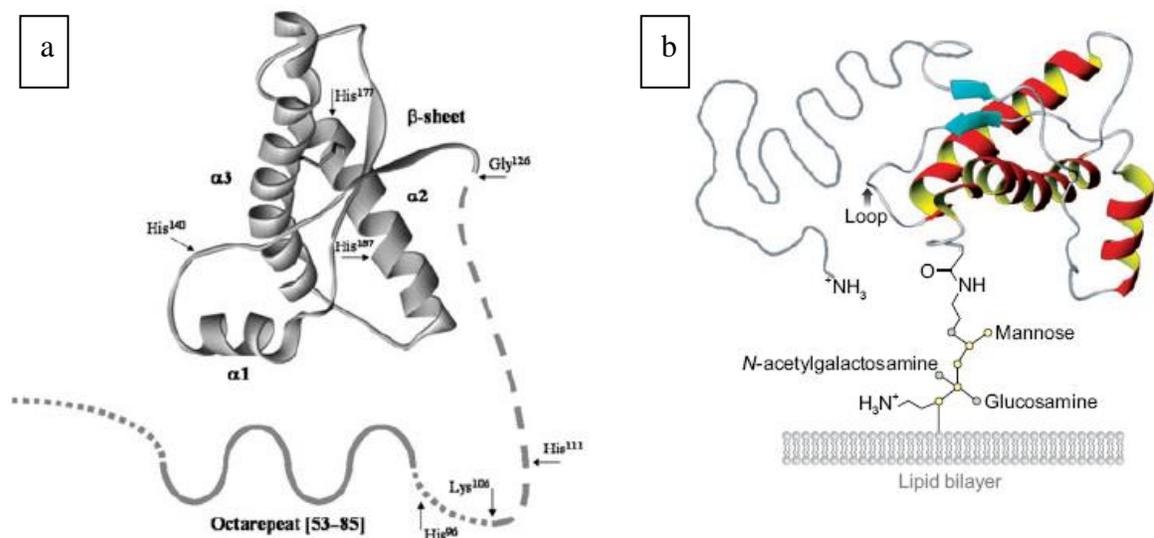
(a) Los datos fueron recolectados en marzo del 2007 desde la base de datos del Mouse Genome, Mouse Genome Informatics, el laboratorio Jackson, Bar Harbor, Maine <<http://www.informatics.jax.org>> (Ryou, 2007).

La PrP<sup>C</sup> es una glicoproteína formada por una cadena polipeptídica de 250 a 260 aminoácidos, dependiendo de la especie, el residuo 209 tiene un único puente disulfuro, dos sitios de N-glicosilación y una cadena de inositol fosfolipídica glicolisada. Está localizada

en los microdominios de membranas ricas en colesterol llamados puentes (*rafts*) o dominios de caveolina (*caveolae - like*). Sin embargo, también ha sido detectado PrP<sup>C</sup> en el citosol. (Noinville *et al.*, 2008; Zomosa-Signoret *et al.*, 2008).

La proteína priónica celular es una glicoproteína acoplada a nitrógeno, normalmente unida a la membrana celular neuronal por medio de una cadena de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Dormont, 2002; Ronga *et al.*, 2006); tiene una vida media en la superficie celular de 5 horas, después de la cual la proteína es incorporada a través de mecanismos dependientes de caveolina y es degradada en compartimentos endolisosomales. La conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> ocurre durante este proceso de internalización (Dormont, 2002), como resultado de la conversión post-traslacional de la proteína normal PrP<sup>C</sup> codificadas por el hospedero (Fournier y Grigoriev, 2001; Crozet *et al.*, 2008). Con la generación de ratones transgénicos que no expresan estas cadenas (versión oculta de PrP<sup>C</sup>), se ha demostrado recientemente que los ancladores de membrana son un prerequisite crucial para las toxicidades producidas por los priones, la que da como resultado una EET clínica. La PrP<sup>C</sup> también cuenta con una unión disulfuro intramolecular (Cys 179 - Cys 214), la cual le entrega estabilidad a la estructura en el C-terminal de la proteína. Se describe en la figura 1, un esquema de la estructura de toda la forma celular benigna de la PrP, que consiste de una cola poco estructurada rodeada por los residuos 23 – 125 y un dominio globular compuesto por los residuos 126 – 231, con una estructura hecha de tres alfa hélices y una corta lámina beta (Ronga *et al.*, 2006).

El dominio C-terminal que fue determinado por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), en la primera estructura tridimensional de la PrP<sup>C</sup>, comprendía un dominio globular 121 al 231 de la PrP murina. Desde entonces, varias RMN de las estructuras de diferentes especies de mamíferos realizadas, han mostrado el mismo plegamiento global (Fig. 1), que consiste en una pequeña alfa hélice ( $\alpha$ 1) y dos hélices antiparalelas ( $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3) unidas por un único puente disulfido (Lysek *et al.*, 2004; Noinville *et al.*, 2008).



**Figura 1: Esquema de la estructura de la PrP.** (a) Los principales residuos son indicados con una flecha. (b) Estructura terciaria de la proteína priónica celular inserta en la bicapa lipídica, incluye la estructura amina en la cola terminal (gris) y el GPI ancla. Las  $\alpha$  – hélices son indicadas en rojo, los plegamientos  $\beta$  antiparalelos están en color turquesa. Los residuos de azúcar se muestran como pequeños círculos rojos (Aguzzi *et al.*, 2008).

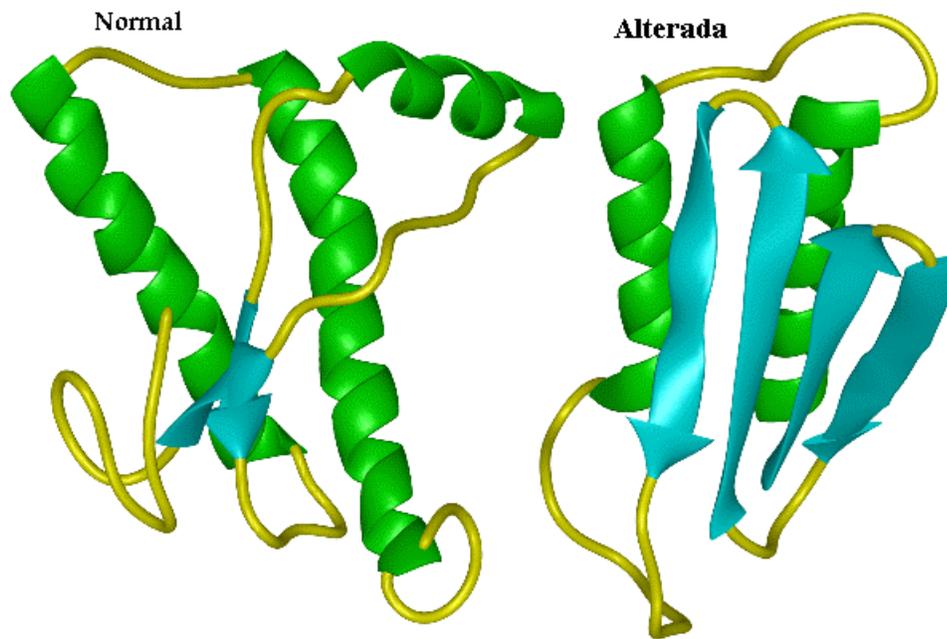
Las dos áreas del dominio globular de la PrP<sup>C</sup> se han sugerido como importantes para el desarrollo de las EETs. La Hélice  $\alpha$ -1 se ha implicado como un sitio de interacción primaria con la PrP<sup>Sc</sup>, isoforma asociada a las EETs. El epítopo compuesto por el *loop* 166 – 172 más el C-terminal y la hélice  $\alpha$ -3 han sido sugeridas como el sitio de reconocimiento por una chaperona convertidora (Lysek *et al.*, 2004). La secuencia aminoacídica primaria y la exposición de modificación en ambas isoformas de PrP<sup>Sc</sup> y PrP<sup>C</sup> son idénticas excepto por su conformación tridimensional, la que consecuentemente se diferencia en las propiedades bioquímicas y biofísicas de ambas isoformas (Tabla 3) (Mabbott *et al.*, 1997; Bermejo y Muñoz, 2001; Torres *et al.*, 2001; Ryou, 2007).

**TABLA N° 3. Comparación de la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup>**

<b>Propiedades</b>	<b>PrP<sup>C</sup></b>	<b>PrP<sup>Sc</sup></b>
<b>Proteína</b>	Proteína celular normal	Proteína asociada a la enfermedad, anormal
<b>Infectividad</b>	No infecciosa	Infecciosa, patogénica
<b>Plegamiento</b>	Principalmente $\alpha$ - hélices	Abundante conformación $\beta$ plegada
<b>Solubilidad</b>	Fácilmente soluble (hidrofílica)	Insoluble (hidrofóbica)
<b>Digestión de Proteasas</b>	Sensible	Parcialmente, pero altamente resistente
<b>Reactividad de anticuerpos</b>	Alta reactividad principalmente a anticuerpos anti- PrP	No reacciona frente a anticuerpos anti PrP <sup>(a)</sup>

(a) La disponibilidad de anticuerpos específicos de PrP<sup>Sc</sup> es controversial (Ryou, 2007).

La estructura secundaria de la PrP<sup>C</sup> propuesta por estudios de RMN, incluye 3  $\alpha$ -hélices y 2 cadenas cortas  $\beta$ . Se sugiere que la PrP<sup>C</sup> esta compuesta de alrededor de 40% de  $\alpha$ -hélice y 3 % de conformación  $\beta$ , cuyo tamaño es de entre los 33 y 35 kDa (PrP 33-35). Mientras que la PrP<sup>Sc</sup> (Fig. 2), esta compuesta por un 30% de  $\alpha$ -hélice y 40% de conformación  $\beta$ . El aumento del contenido de plegamiento  $\beta$  en la PrP<sup>Sc</sup>, se debe principalmente a una transición de la conformación entre la región hidrofóbica (residuos aminoaciditos 90 – 140) y una porción de las hélices de la molécula PrP<sup>C</sup>, estos eventos moleculares hacen que la molécula sea hidrofóbica y parcialmente resistente a la digestión por proteinasa K, resultando una proteína de 27 a 30 kDa (PrP 27-30). La conformación de la región alterada de la PrP<sup>Sc</sup>, se piensa que forma tramos repetidos de cortas hojas  $\beta$  y agregados, para generar multímeros de PrP<sup>Sc</sup>, el cual puede agregarse en fibrillas amiloides de PrP. Aún no está claro si estos agregados son los que causan el daño celular o son simplemente un producto subyacente del desarrollo de la enfermedad (Mabbott *et al.*, 1997; Bermejo y Muñoz, 2001; Torres *et al.*, 2001; Ryou, 2007).



**Figura 2: Diferencia conformacional entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup>.** Se representa el cambio conformacional de la proteína priónica normal (PrP<sup>C</sup>) que posee mayor cantidad de plegamiento alfa, versus la proteína priónica alterada (PrP<sup>Sc</sup>) que posee mayor cantidad de plegamiento beta. ([http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/research/gallery/aw\\_prion.gif](http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/research/gallery/aw_prion.gif)).

La PrP<sup>C</sup> se expresa muy abundantemente en el cerebro, sin embargo también ha sido detectada en otros tejidos no neuronales, tales como células linfoides, pulmón, corazón, riñón, tracto gastrointestinal, músculo y glándula mamaria. En los últimos años, se han descrito algunas posibles funciones para la proteína priónica celular. Es así que, se ha postulado que la PrP<sup>C</sup> podría estar involucrada en una o más de las siguientes acciones: metabolismo de neurotransmisores, activación de células inmunes, adhesión celular, interacción con la matriz extracelular (PrP<sup>C</sup> puede unirse al precursor del receptor de laminina), transducción de señales (la coestimulación de la PrP<sup>C</sup>, induce una modulación de la fosforilación de la Fyn kinasa), metabolismo del cobre y actividad antioxidante: compensando el estrés oxidativo al poder captar cuatro moléculas de Cu<sup>+2</sup> en el dominio octapéptico repetitivo (residuos 51-91 contienen una rara repetición rica en glicina cada ocho residuos), o muerte celular programada (Mabbott *et al.*, 1997; Mabbott y Bruce, 2001; Dormont, 2002; Aguzzi *et al.*, 2008; Zomosa-Signoret *et al.*, 2008), además se describe un

posible rol en el ritmo de la actividad circadiana y patrones del sueño (Mabbott y Bruce, 2001).

Todas las enfermedades priónicas comparten un mecanismo molecular común, en la que la capacidad infecciosa y patógena de la PrP<sup>Sc</sup> se debe, muy probablemente a su conformación anormal, la que genera su depósito cerebral como placas de amiloides insolubles, la resistencia a las proteasas (Mabbott *et al.*, 1997; Bermejo y Muñoz, 2001) y su capacidad patogénica para el sistema nervioso central (SNC). La conformación anormal de la PrP, podría ocurrir espontáneamente como un evento raro o frecuente cuando la secuencia de la proteína es alterada por una mutación, o bien, es inducida por un prión infeccioso (PrP<sup>Sc</sup>). Este cambio en la concepción de la biología tradicional, que dota a una proteína la capacidad infecciosa (se multiplica), es el gran aporte conceptual de Prusiner (Bermejo y Muñoz, 2001; Ryou, 2007).

La transmisión es fácil entre individuos de la misma especie, pero también es posible entre diferentes especies. La resistencia de la barrera de especies variable, por ejemplo: la EEB no se transmite hacia el hámster, sin embargo es fácilmente transmisible hacia el ratón. El principal determinante molecular de la barrera de especies es la homología entre los genes PrP del donador y de los genes PrP del receptor; otros genes que podrían jugar un rol en la susceptibilidad al agente de las EETs serían, principalmente los genes de histocompatibilidad (Dormont, 2002).

Como resultado de la conversión del prión gatillada por la “infección” del prión, mutación del gen PrP, o de forma espontánea (causa desconocida), se genera una forma plegada anormalmente: PrP<sup>Sc</sup>, la que se acumula progresivamente y se deposita como placas amiloide en el cerebro. Aunque la patogénesis del prión está asociada con la PrP<sup>Sc</sup>, no está claro cuando la PrP<sup>Sc</sup> adquiere una función tóxica, para desencadenar los eventos que causan las características patológicas tales como la neurotoxicidad, el estrés celular, la muerte celular y la neurodegeneración. Estudios recientes sugieren que la PrP<sup>Sc</sup> puede causar efectos patológicos directos sobre las células neuronales o indirectamente a través de células de la glía, gatillando una cascada de signos transduccionales que producen apoptosis.

Alternativamente, la pérdida de la función fisiológica de la PrP<sup>C</sup> debido al cambio conformacional, puede resultar en un trastorno de la transducción de señales para la sobrevivencia o protección en las que fisiológicamente participa la PrP<sup>C</sup>. La patogénesis de las enfermedades priónicas también se piensa que es facilitada no por PrP<sup>Sc</sup> o pérdida de PrP<sup>C</sup>, sino que por una conformación priónica intermedia formada durante la conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> (Ryou, 2007).

Durante la patogénesis del prión, la PrP<sup>C</sup> sufre una alteración conformacional generándose una PrP<sup>Sc</sup>. Se han sugerido dos modelos diferentes para la conversión del prión y su agregación, (a) modelo de polimerización nucleada por condensación no catalítica sugerida por Jarret y Lansbury representa un proceso hipotético de agregación priónica, donde una PrP<sup>Sc</sup> multimérica actúa como un núcleo de polimerización. En este modelo, el multímero de PrP<sup>Sc</sup> estabiliza rápidamente muchos monómeros de moléculas de PrP por la incorporación dentro de oligómeros de PrP<sup>Sc</sup> (Ryou, 2007). Este modelo propone que el cambio conformacional es termodinámicamente controlado: la conversión de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> es un proceso reversible, pero su equilibrio favorece fuertemente la conformación de PrP<sup>C</sup>. La conversión hacia PrP<sup>Sc</sup> es establecida y estabilizada sólo cuando se agrega sobre un núcleo formado como cristal o agregado de PrP<sup>Sc</sup>. Cuando este núcleo está presente, se favorece aceleradamente la adición de monómeros. De acuerdo a esta hipótesis de nucleación, los agregados podrían ser una propiedad intrínseca para la infección: los monómeros de PrP<sup>Sc</sup> pueden ser inofensivos, pero pueden ser propensos a generar agregados de PrP<sup>Sc</sup> (Aguzzi *et al.*, 2008). (b) heterodímero o conversión asistida por patrón directo, modelo propuesto por Prusiner, que postula que los monómeros de PrP<sup>Sc</sup> ajustados anormalmente sirven como plantilla para convertir la PrP<sup>C</sup> en una forma aberrante, por medio de la interacción de estas 2 moléculas (Ryou, 2007). Este modelo propone que sobre la infección de una célula hospedero apropiada, la conformación alterada PrP<sup>Sc</sup> inicia una cascada catalítica usando la PrP<sup>C</sup> o un intermediario parcialmente desplegado (PrP<sup>X</sup>), surgidas desde fluctuaciones azarosas en la estructura de la PrP<sup>C</sup>, como un sustrato, convirtiéndolo por un cambio conformacional, en una nueva proteína con alto plegamiento  $\beta$ . Esta PrP<sup>Sc</sup> recientemente formada, puede transformar una nueva molécula de PrP<sup>C</sup> en una nueva entidad resistente a proteinasa K. El cambio conformacional es cinéticamente

controlado; así una barrera de activación de gran energía previene la conversión espontánea en velocidades detectables. La formación de PrP<sup>C</sup> a complejos heteroméricos de PrP<sup>Sc</sup>, puede tener una barrera de activación de baja energética en la formación de PrP<sup>Sc</sup>. El desplegamiento ampliado y el proceso de replegado se cree que requiere de actividad de chaperonas y de energía (Aguzzi *et al.*, 2008). En este modelo, después de ser convertido en PrP<sup>Sc</sup>, se forman los agregados de priones. En ambos modelos se hace diferencia entre el rol de los agregados de PrP<sup>Sc</sup> durante la propagación del prión. Los agregados de PrP<sup>Sc</sup> no son considerados esenciales para el proceso de conversión del prión en el modelo de conversión asistida por plantilla, pero es indispensable para la propagación del prión en el modelo de polimerización nucleada (Torres *et al.*, 2001; Ryou, 2007).

La PrP<sup>Sc</sup> es resultante de una conformación alterada de la PrP<sup>C</sup>, la que se produce durante un periodo clínico encubierto de la enfermedad. Posterior al proceso de conversión, la PrP anormal puede unirse a restos de membrana o puede encargarse del mecanismo de polimerización, llegando a la formación de estructuras fibrilares. Estas estructuras aparecen en el cerebro como una gran acumulación de PrP<sup>Sc</sup> denominada placas amiloides (Fournier y Grigoriev, 2001). Es así, que la enfermedad producida por priones se caracteriza histopatológicamente por la pérdida neuronal, vacuolización de los cuerpos neuronales y el neuropilo de la materia gris (espongiosis), astrocitosis reactiva y microgliosis (Miller *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 2004; Crozet *et al.*, 2008), sin embargo la causa de esta neurotoxicidad esta poco clara (Aguzzi *et al.*, 2008); los signos clínicos y la patología que producen variará dependiendo de la especie e incluso de cada animal afectado. En todos los casos, el desarrollo de la enfermedad es muy lento y los tiempos de incubación con ausencia total de síntomas, son extremadamente largos, 2-10 años, dependiendo de la especie y de los individuos (Torres *et al.*, 2001).

### **Scrapie.**

El Scrapie clásico es una enfermedad neurológica fatal y progresiva de ovejas y cabras (DEFRA, 2005). Su existencia en el ganado ovino de países de Europa Occidental es conocida hace al menos 250 años, lo que la convierte en la primera encefalopatía

espongiforme transmisible (EET) o enfermedad priónica detectada. La enfermedad permanece endémica en muchos países europeos y ha sido también descrita en varios países de otros continentes. Sin embargo, Australia y Nueva Zelanda han conseguido mantener una situación de libres de la enfermedad, gracias a rigurosas medidas preventivas. Sin embargo, debido a la ausencia de protocolos de vigilancia, el estatus de numerosos países con respecto al Scrapie es desconocido. Dentro de la Unión Europea, el Scrapie es de declaración obligatoria a partir de enero de 1993 (González, 2002).

A pesar de que esta EET es conocida hace tanto tiempo, su importancia epidemiológica aumentó sólo en la década de los 80s, cuando se descubre su relación con el origen de la EEB (Madariaga, 2009).

La información sanitaria aportada por la Organización Mundial de Sanidad Animal, indica que el Scrapie posee una mayor distribución en países de europeos, entre los que se cuentan Alemania, Bélgica, España, Finlandia, Reino Unido e Irlanda. En Asia y África, en varios países se ha descrito esta EET. En América, en tanto, los países libres superan a los países que presentan o han presentado la enfermedad, habiéndose descrito la presencia de la enfermedad en Canadá, Estados Unidos y Brasil (OIE, 2007a).

En Chile, la actual situación sanitaria indica que el Scrapie no ha sido descrito, aún cuando es de denuncia obligatoria. A pesar de esto, sólo existen algunas medidas preventivas (Madariaga, 2009).

Contrariamente a la EEB, el Scrapie es una enfermedad endémica en donde el agente es transmitido entre las ovejas bajo condiciones naturales. Estudios epidemiológicos, sugieren que el prión del Scrapie se disemina horizontalmente, ya sea por contacto directo entre los animales o a través de la contaminación del medio ambiente. Evidencia experimental reciente ha demostrado que la transmisión intra-uterina (vertical) también puede ser posible (Detwiler y Baylis, 2003; Caplazi *et al.*, 2004; Doherr, 2007; van Keulen *et al.*, 2008a). Así como todos los agentes de las EETs, el del Scrapie también es resistente a diversos procedimientos de esterilización o inactivación. Este hecho, favorece indudablemente las

posibilidades de transmisión del Scrapie en condiciones naturales. Los mejores métodos de inactivación del agente son en la actualidad el hipoclorito de sodio (20000ppm) y el autoclave a 121°C durante 30 min en hidróxido sódico 1M (González, 2002).

El Scrapie se ha descrito en la mayoría de las razas ovinas, aunque en algunas con mayor frecuencia que otras, existe una clara base genética que determina resistencia o baja prevalencia de la enfermedad clínica. Esta se ha descrito también, aunque con notable menor frecuencia, en cabras y en muflones. En el ovino, la susceptibilidad o resistencia a Scrapie está ligada a polimorfismos en el gen que codifica la proteína prión o gen PrP. En concreto, se han determinado tres codones de importancia en las posiciones 136, 154 y 171 de la secuencia de aminoácidos de esta proteína, cuyos polimorfismos son valina (V) o alanina (A), arginina (R) o histidina (H) y arginina (R), glutamina (Q) o histidina (H), respectivamente. Sólo las ovejas de determinados genotipos PrP desarrollan la enfermedad clínica. En las razas denominadas “valinas” (ej. Texel, Romanov, Cheviot, Poll-Dorset y Shetland), los animales que presentan el alelo VRQ son los más susceptibles, los que presentan alelos ARQ, ARH y AHQ son de sensibilidad intermedia, y el alelo que confiere resistencia es el ARR. En las razas denominadas “no valinas” (ej. Sarda, Suffolk y Romney), la presencia de este aminoácido en posición 136 es extremadamente rara, siendo los animales ARQ/ARQ los más sensibles. La sensibilidad de los distintos genotipos al Scrapie, se manifiesta en forma de proporción de animales que desarrollan la enfermedad y duración del periodo de incubación. En consecuencia los animales del genotipo VRQ/VRQ (razas “valinas”) o ARQ/ARQ (razas “no valinas”) son los más sensibles, mientras que el Scrapie no se ha descrito en ovejas del genotipo ARR/ARR, siendo así las más resistentes (González, 2002; Detwiler y Baylis, 2003; Caplazi *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2004; Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Clínicamente la enfermedad se desarrolla en ovejas de entre 2 a 5 años de edad y tiene un período de incubación de al menos 1 año (Caplazi *et al.*, 2004; Gavier-Widén. *et al.*, 2005). La edad de aparición de los signos clínicos es función del periodo de incubación y éste a su vez depende del genotipo del animal, de la edad en la que acontece la infección y de la

dosis infectiva. La incidencia de la enfermedad en rebaños afectados oscila entre el 1% y el 10% anual (González, 2002; Detwiler y Baylis, 2003).

El cuadro clínico es insidioso y la enfermedad clínicamente sólo aparece tras la diseminación de la infección al SNC. Los signos clínicos varían ampliamente entre los animales. En general, los signos tempranos son cambios sutiles de la conducta o temperamento seguidas por signos neurológicos progresivos obvios, que incluyen incoordinación, temblores, ataxia, movimientos rápidos de lengua y labios. En casos terminales hay decaimiento y pérdida de la condición corporal. El animal suele presentar prurito, el que se reconoce porque este se rasca compulsivamente contra objetos, de ahí viene la denominación Scrapie, e incluso mordisqueo de la piel, desembocando en la pérdida de lana, junto con la aparición de escoriaciones. Otros signos neurológicos incluyen en ocasiones rechinar de dientes, postura anormal baja la cabeza, temblores, ataques pseudos-epilépticos y ceguera (Tyler *et al.*, 1999; Bermejo y Muñoz, 2001; Hamir *et al.*, 2001; González, 2002; Detwiler y Baylis, 2003; Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Existe una diversidad de presentaciones y de predominios de signos clínicos descritos en poblaciones y razas ovinas diferentes o incluso en animales distintos. La progresión de la enfermedad es también muy variable, oscilando desde unos pocos días hasta varios meses. El diagnóstico clínico del Scrapie a nivel individual es por lo tanto difícil, especialmente cuando se desconoce el estatus de los rebaños en cuestión y toda una serie de enfermedades que deben ser tenidas en cuenta en el diagnóstico diferencial. Estas incluyen: ectoparasitismo, pseudorabia o enfermedad de Aujeszky, rabia, listeriosis, maedi visna, toxemia de la preñez, hipomagnesemia e intoxicación por plantas y compuestos químicos (González, 2002).

Aunque el Scrapie se caracteriza por ser una enfermedad neurológica, también es posible reconocer la diseminación sistémica del agente, particularmente a los tejidos del sistema linforreticular (SLR). Esta fase sistémica, puede ser evidenciada por las acumulaciones de la forma asociada de la proteína del prión (PrP<sup>Sc</sup>) que casi invariablemente precede a la patología del SNC (Davies *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008).

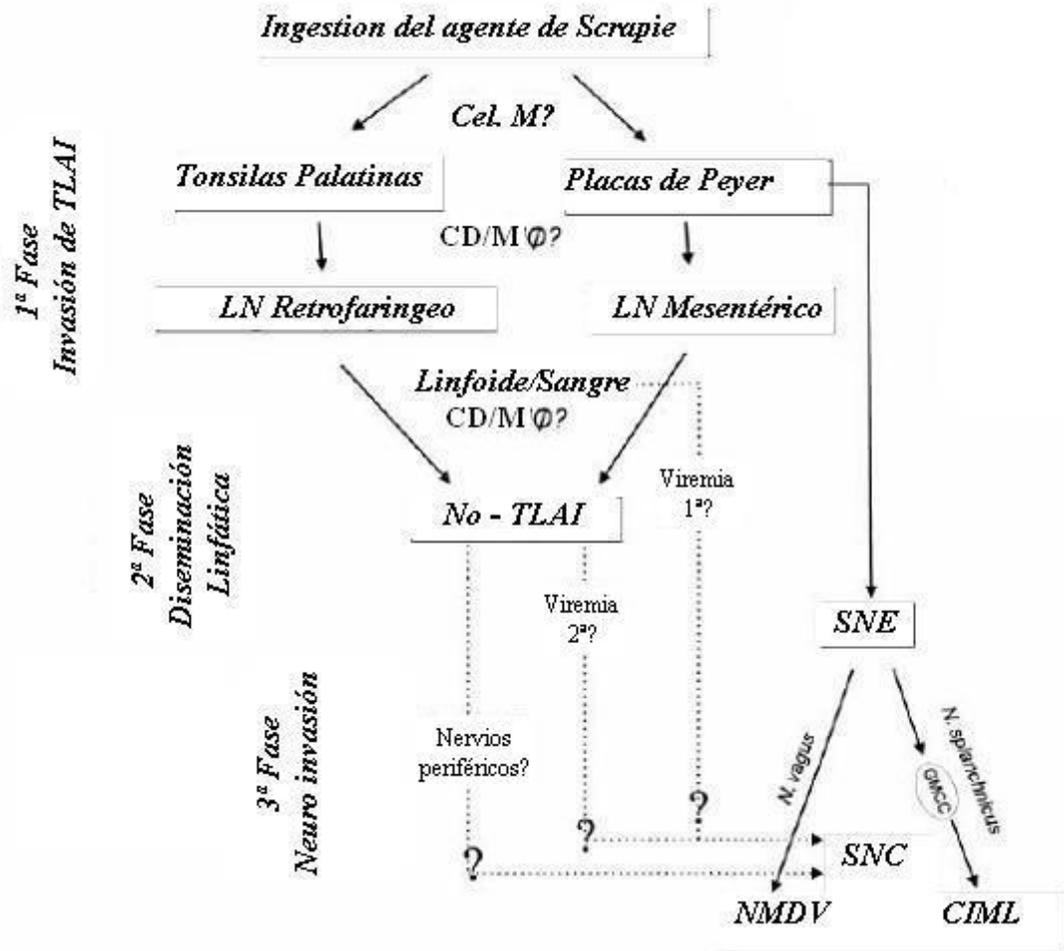
Hamir *et al.*, (2001), confirmaron la presencia de la PrP<sup>Sc</sup> en las tonsilas de los ovinos utilizando la técnicas diagnóstica de Inmunohistoquímica (IHQ), la que fue confirmada por Westernblot.

Por lo tanto, se observa que la PrP<sup>Sc</sup> se acumula sistemáticamente en el tejido nervioso, tejidos linfoides varios, relacionados o no con el tracto digestivo, los que preceden al depósito de PrP<sup>Sc</sup> en el cerebro. Además, existe evidencia de que se ha encontrado esta proteína priónica alterada en células trofoblásticas (del epitelio coriónico) de los placentomas, pero no en células del epitelio endometrial adyacente de las carúnculas maternas interdigitales, miometrio y plexos nerviosos asociados. Tampoco se observa en el parénquima mamario y médula ósea (Caplazi *et al.*, 2004).

### **Patogenia del Scrapie.**

La principal vía de ingreso del agente de la EET es a través de la vía oral, aunque las escarificaciones de la piel y el daño de las membranas mucosas/conjuntivas se sugieren como rutas alternativas. En el Scrapie, el prión está presente en el medio ambiente y se puede consumir oralmente a través de pastos contaminados (Detwiler y Baylis, 2003; Caplazi *et al.*, 2004; Beekes y McBride, 2007; van Keulen *et al.*, 2008a). La transmisión ocurre comúnmente por transmisión materno perinatal, a través de la exposición oral de los neonatos al prión dentro de los fluidos placentarios (Caplazi *et al.*, 2004).

La patogénesis del prión es un proceso dinámico que puede dividirse, según espacio y tiempo, en tres fases: (i) infección y replicación periférica (acumulación del agente infeccioso en el tejido linfoide); (ii) migración desde la periferia hacia el SNC (neuroinvasión), y (iii) neurodegeneración (Fig. 3) (van Keulen *et al.*, 2002; Aguzzi *et al.*, 2004; Caplazi *et al.*, 2004; Aguzzi, 2006). Según Beekes y McBride (2007), posterior a la neuroinvasión, seguirían dos fases: ascensión y diseminación dentro del cerebro y médula espinal y una diseminación centrífuga desde el SCN hacia sitios periféricos tales como el músculo.

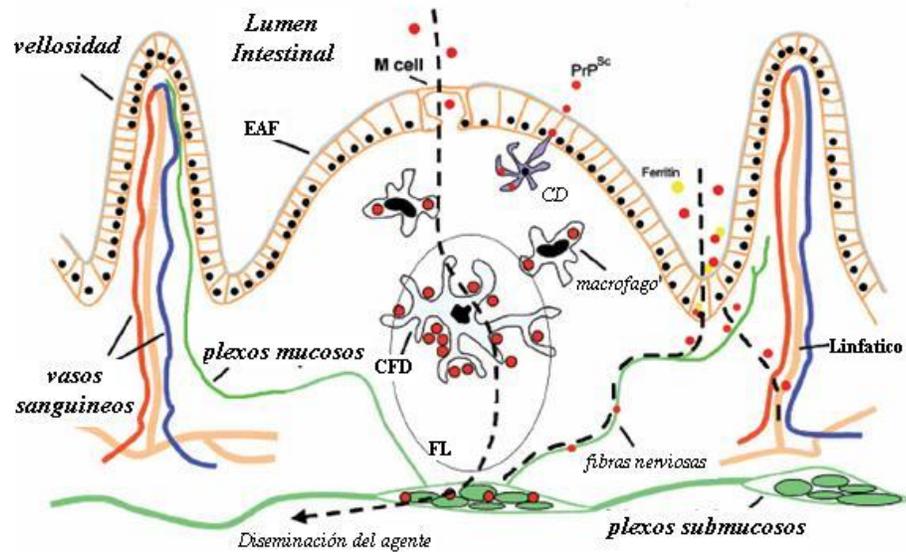


**Figura 3: Modelo esquemático de la patogénesis del Scrapie en las ovejas.** Se muestran las tres fases: (i) infección de los TLAI; (ii) diseminación linfática no en TLAI; (iii) neuroinvasión del SNC. Las líneas de puntos corresponden a rutas hipotéticas. TLAI: tejido linfoide asociado a intestino; CD: células dendríticas; Mφ: Macrófago; LN: linfonódulo; SNE: sistema nervioso entérico; SNC: sistema nervioso central; NMDV: núcleo motor dorsal del vago; CIML: columna intermediolateral; GMCC: ganglio mesentérico craneal/celiaco (van Keulen *et al.*, 2002).

El tropismo del prión varía dramáticamente entre las especies animales y esto en parte depende de la cepa en particular del agente del prión, por ejemplo: el prión es linfotrópico en Scrapie y vCJD, pero no así en sCDJ y EEB. Diferentes cepas de prión pueden realizar distintas rutas de replicación periféricas en modelos experimentales de Scrapie y además las propiedades de codificación de la cepa, pueden también determinar la ruta de replicación periférica (Aguzzi *et al.*, 2004).

La patogénesis de la enfermedad priónica ha establecido que la replicación del agente ocurre en altos títulos tanto en los tejidos linfoides como el bazo y linfonódulos, previo a la neuroinvasión y la consecuente detección en SNC (Aguzzi *et al.*, 2004; Aguzzi, 2006; Parveen *et al.*, 2005). Por medio de IHQ, se han localizado depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en los centros germinales de folículos linfoides siguiendo un patrón multifocal aleatorio. La intensidad de la reacción varía de forma individual entre los individuos, pero no se correlaciona con la edad o estatus clínico (Caplazi *et al.*, 2004).

Se desconoce como el agente una vez que es ingerido cruza la barrera mucosa, pero existen tres vías posibles. La primera es a través de células – M, un tipo de célula presente en los folículos asociados al epitelio de la mucosa intestinal y tonsilas, que se especializa en el transporte de macromoléculas y partículas que cruzan el epitelio. La segunda por la acción de enzimas digestivas, que pueden fragmentar al agente en un núcleo infeccioso resistente a proteasas. La tercera es por medio de células dendríticas, que capturan antígenos por medio de sus procesos dendríticos insertos en el lumen intestinal (Fig. 4) (van Keulen *et al.*, 2002; Beekes y McBride, 2007; van Keulen *et al.*, 2008a).

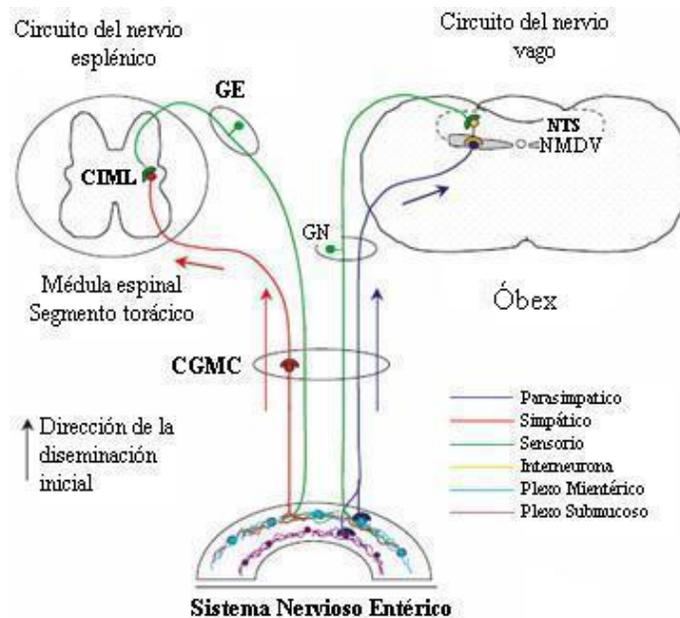


**Figura 4: Representación esquemática de las posibles vías para cruzar la barrera epitelial intestinal y la subsiguiente invasión del SNC.** Después de la ingestión, PrP<sup>Sc</sup> puede ser tomada por las células M o las células dendríticas y ser transportada hacia los folículos linfoides (FL) o las placas de peyer subyacente al epitelio asociado al folículo (EAF). Dentro de los folículos linfoides se acumula PrP<sup>Sc</sup> en las células dendríticas foliculares y son tomadas por macrófagos foliculares. Esta acumulación de PrP<sup>Sc</sup> puede facilitar la infección de los plexos submucosos vecinos del sistema nervioso entérico (SNE). Alternativamente, la PrP<sup>Sc</sup> puede ser captada al formar complejos con ferritina y ser transitada por las células epiteliales intestinales a través de la vía de ferritina. Una vez cruzado el epitelio, los plexos mucosos del SNE pueden conseguir infectar por diseminación neural de los plexos submucosos (van Keulen *et al.*, 2008a).

Las células dendríticas son células del sistema inmune que están especialmente involucradas en el proceso de neuroinvasión. Estas células se caracterizan por ser bifuncionales, ya que se encargan de la formación y mantenimiento de la microarquitectura del linfonódulo, pero también juega un rol en el complejo inmune del atrapamiento y captura del antígeno por medio de los receptores Fc<sub>γ</sub> y unión de antígenos opsonizantes hacia receptores del complemento CD21/CD35. Existen estudios que han demostrado que el sistema del complemento es relevante para la patogénesis del prión (Aguzzi *et al.*, 2004).

Después de cruzar la mucosa, la PrP<sup>Sc</sup> se acumula y replica primero en los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), tonsilas y placas de Peyer. Posterior a la replicación en los GALT, el prión es llevado hacia los linfonódulos, así desde las tonsilas va hacia los linfonodos retrofaringeos y desde las placas de Peyer hacia los linfonodos mesentéricos. El primer tejido neuronal en el cual la PrP<sup>Sc</sup> puede ser demostrada, tanto en el Scrapie como

en la EEB, es el sistema nervioso entérico (SNE) del intestino (van Keulen *et al.*, 2008a). A continuación de la invasión del SNE, el prión asciende a través de las vías neuronales eferentes parasimpáticas y simpáticas hacia el cerebro (vía ganglio mesentérico craneal/abdominal). La puerta de entrada al cerebro, es el núcleo motor dorsal del vago (NMDV) en la médula oblonga, a nivel del óbex y la columna intermediolateral (CIML) en los segmentos torácicos de la médula espinal (Fig. 5). Desde estos sitios en el SNC, la infección se disemina en dirección ascendente y descendente, hasta finalmente incluir la innervación completa (van Keulen *et al.*, 2008a). Desde el punto de vista anatomopatológico, se puede decir que macroscópicamente, los cerebros de los animales infectados parecen normales, mientras que microscópicamente los cambios más notorios consisten en astrogliosis, vacuolización intracelular, pérdida de neuronas y formación de placas amiloides ocasionales (Tyler *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2001; Crozet *et al.*, 2008).



**Figura 5:** Vías neuronales involucradas en la diseminación centripeta del prión desde el intestino hacia el cerebro y la médula espinal después de la infección vía oral. La diseminación inicial hacia SNC ocurre en dirección retrograda a lo largo de las fibras parasimpáticas y simpáticas de los nervios vagos y esplénico. Los linfonodos entéricos y abdominales están involucrados en la patogénesis temprana. CGMC: complejo del ganglio mesentérico y celiaco. NMDV: núcleo motor dorsal del nervio vago. GE: Ganglio espinal. CIML: columna intermediolateral. GN: ganglio nodoso. NTS: Núcleo tracto solitario (Beekes y McBride, 2007).

## **Diagnóstico y detección de la proteína priónica.**

La regla de oro para iniciar el diagnóstico clínico es la detección de la infectividad del prión. Hasta hace poco, el único método viable para probar la infectividad del prión fue el uso de bioensayos en ratones, en la cual una serie de diluciones del material a probar eran inoculadas en el ratón y se observaba la enfermedad. Sin embargo, este procedimiento sufre de inexactitud y es limitado por los requerimientos de los ratones y entrega un respuesta demorosa (Aguzzi *et al.*, 2004).

El Scrapie y la EEB se han diagnosticado tradicionalmente por métodos histopatológicos, clínicos y epidemiológicos, puesto que los animales naturalmente infectados no responden serológicamente a la PrP<sup>Sc</sup> y el diagnóstico por medio de la inoculación de animales de laboratorio puede requerir sobre 18 meses (Katz *et al.*, 1995).

El diagnóstico de las enfermedades producidas por priones, presenta una serie de problemas debidos a características que le son propias. Por una parte, estos agentes no inducen una respuesta inmune, que permita detectar la presencia de anticuerpos específicos en el suero. Por otra, la ausencia de un ácido nucleico asociado a la partícula priónica, impide el uso de herramientas como el PCR para su análisis. Estas limitaciones obligan a basar el diagnóstico en la detección de (Hamir *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2001; Debeer *et al.*, 2002):

- las alteraciones histopatológicas producidas por la enfermedad.
- la isoforma infectiva de la proteína del prión (PrP<sup>Sc</sup>).
- la infectividad mediante bioensayos apropiados.

En ausencia de métodos de aislamiento *in vitro* del agente causal, el diagnóstico del Scrapie recae, en la demostración de lesiones histopatológicas en el SNC o en la detección de la forma anormal de la PrP en tejidos de los animales afectados. Esta última puede llevarse a cabo por varios métodos, incluido el inmunohistoquímico (IHQ) (González, 2002; Detwiler y Baylis, 2003).

**Lesiones histopatológicas:** la infección lleva a la acumulación de la forma anormal de la proteína priónica en tejidos del sistema nervioso central y en otros órganos de los animales afectados (Hamir *et al.*, 2001). Es así como, no hay lesiones macroscópicas específicas en el Scrapie y las microscópicas se confinan al SNC, particularmente al encéfalo y son de naturaleza neurodegenerativa. Sin alteraciones inflamatorias específicas, ni lesiones degenerativas primarias en la sustancia blanca. La lesión más característica es la vacuolización neuronal, tanto en el citoplasma del soma neuronal como en sus prolongaciones axonales y dendríticas, es decir, en el neuropilo. Estas lesiones vacuolares se acompañan de otras menos evidentes o constantes, como son otros tipos de degeneración neuronal (neuronas oscuras y retraídas), pérdida de neuronas, gliosis (especialmente astrocitosis) y amiloidosis cerebrovascular. Las lesiones presentan un patrón bilateral característico y la vacuolización es más patente en el tronco del encéfalo que en otras áreas, especialmente a nivel del óbex, el cual contiene áreas específicas utilizadas para el diagnóstico de EETs, las que corresponden principalmente a los núcleos del tracto espinal del nervio trigémino, los núcleos del tracto solitario y el núcleo dorsal del nervio vago (Debeer *et al.*, 2002; González, 2002).

Diversos factores contribuyen a dificultar el diagnóstico histopatológico. La vacuolización del pericarion o soma neuronal no es específica del Scrapie y puede detectarse en animales sanos, aunque el número de vacuolas en estos últimos es mucho menor. Las otras lesiones mencionadas son menos constantes y tampoco son específicas, aunque en su conjunto y acompañadas de abundantes vacuolas, permiten establecer el diagnóstico. Sin embargo, la severidad y la extensión de las lesiones varían entre individuos, sin que exista una correlación clara con la gravedad de los signos clínicos. Es así que, se han descrito casos individuales de Scrapie natural en los que la vacuolización es virtualmente indetectable en el examen histológico (Miller *et al.*, 1993; González, 2002; Grassi *et al.*, 2008). Por lo tanto, una sospecha clínica o clínico – epidemiológica de Scrapie, no puede refutarse solamente por la ausencia de lesiones características en el encéfalo y es aquí, cuando otros métodos de diagnósticos cobran importancia (González, 2002).

Otra limitación del uso de la histopatológica para el diagnóstico de Scrapie, es que la interpretación acuciosa de la lesión puede verse dificultada o ser imposible de realizar en cerebros que han sido fijados por poco tiempo en formalina (Miller *et al.*, 1993).

**Inmunohistoquímica (IHQ):** reconoce la presencia de la PrP<sup>Sc</sup> a través de una inmunotinción específica en las áreas blanco, es por lo tanto la prueba más específica para las EETs de las disponibles hasta ahora. Además, los análisis IHQs de la distribución topográfica de PrP<sup>Sc</sup> pueden jugar un importante rol en el reconocimiento de las cepas de EETs. Asimismo, la IHQ ofrece la posibilidad de complementar el acercamiento del diagnóstico de la EET, basados en detección bioquímica de PrP<sup>Sc</sup>. El análisis inmunohistoquímico, usualmente es realizado en muestras fijadas en formalina e implica el uso del pretratamiento de los cortes para desenmascarar los epitopes y remover la PrP<sup>C</sup> normal (Debeer *et al.*, 2002; Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Los métodos inmunohistoquímicos pueden ser usados para identificar sitios de distribución intracelulares de la PrP<sup>Sc</sup>, en distintos tipos celulares (mapa epitópico de PrP<sup>Sc</sup>) y en diferentes patrones morfológicos de acumulación (perfil de PrP<sup>Sc</sup>). Existen diferencias en la interpretación de los sitios de disposición de PrP<sup>Sc</sup>, que son descritas para las diversas cepas de ovejas con Scrapie y para los distintos tipos celulares infectados, dentro de razas individuales (Jeffrey y González, 2007).

A diferencia de los métodos del inmunotinción, la IHQ detecta formas anormales de PrP que pueden ser fragmentos o de largo completo, resistente o sensible a la proteasa, a menudo designada como PrP<sup>Sc</sup> (McGovern y Jeffrey, 2007).

La IHQ y el reconocimiento de lesiones histopatológicas, se consideran como los métodos convencionales para diagnosticar Scrapie o EETs en general (Tyler *et al.*, 1999). Existen otras dos técnicas que pertenecen a este grupo que se caracterizan por ser capaces de detectar en muestras de tejido, lesiones características de EETs o formas asociadas de la proteína priónica (PrP<sup>Sc</sup>). Las otras técnicas que pertenecen a este grupo son:

**Prueba de infección experimental (bioensayos):** es el método más sensible y específico para el diagnóstico de EETs, en la cual se reproduce la infección experimentalmente en animales de laboratorio. El animal es inyectado (usualmente vía intracraneal), con un homogenizado preparado desde tejido potencialmente infectado y se espera a la aparición de signos clínicos. Después de la muerte del animal infectado experimentalmente, el desarrollo de la enfermedad es confirmado usando técnicas clásicas (histología, inmunohistología, *Western blot*). Por una razón práctica obvia, estos experimentos se realizan en roedores (ratones, hámsters). Recientemente, la disponibilidad de ratones transgénicos que sobre-expresan el mismo PrP que la especie donadora, ha aumentado significativamente la eficiencia de la transmisión experimental y así se han acortado los periodos de incubación. Sin embargo, estos métodos son a la vez intensamente laboriosos y consumidores de tiempo, para ser usados como un método de rutina o en *screening* de alto rendimiento (Parveen *et al.*, 2005; Grassi *et al.*, 2008). También, el uso de líneas celulares neuronales clonadas altamente susceptibles han probado ser útiles, ya que han permitido una reducción sustancial del tiempo requerido para los bioensayos y pueden llegar a ser automatizados (Aguzzi *et al.*, 2004).

**Westen blot (WB):** fue la primera técnica confirmatoria propuesta por la OIE (organización Internacional de Epizootias). Es un método usado para detectar PrP<sup>Sc</sup> en extractos de tejidos, desde hace unos 20 años. Puesto que todas las muestras siempre contienen PrP<sup>C</sup>, la proteína priónica sensible a proteasas, las muestras son inicial y sistemáticamente tratadas con proteinasa K, después los extractos de tejidos se desnaturan por calor con dodecil sulfato de sodio (SDS); para ser analizado por electroforesis en gel de policramida (PAGE), luego la proteína desnaturada es transferida a un soporte sólido y detectada con un anticuerpo marcado. La especificidad que contiene el *Western blot*, a pesar del hecho que la proteólisis con proteinasa K por una parte altera las característica del peso molecular de la PrP<sup>Sc</sup>, pero por otra destruye a la PrP<sup>C</sup>, ha permitido una detección altamente sensible de la PrP<sup>Sc</sup>. El *Western blot* es comúnmente usado para caracterizar la cepa del prión. Las características de los patrones moleculares (tamaño y relativa intensidad de banda) de las tres glicofomas de PrP<sup>Sc</sup>, y la reacción de ciertos anticuerpos directos contra la parte amino terminal de la PrP pueden, en algunos casos, ser usados para identificar la estructura

molecular de tipo de prión (Gavier-Widén *et al.*, 2005; Parveen *et al.*, 2005; Grassi *et al.*, 2008).

***Detección de SAF (fibrillas asociadas al Scrapie)***: esta se utiliza como uno de los criterios por los cuales una enfermedad puede ser establecida como producida por priones. Por microscopía electrónica, usando tinción negativa, las SAF han sido detectadas en extractos purificados de material encefálico tratados con detergente en ratones inoculados experimentalmente, así como en ovejas con Scrapie experimental y natural. Sin embargo las SAF, no han sido identificadas en cerebros normales de ovejas o roedores, así como tampoco de roedores afectados por virus no convencionales o por injurias químicas. Las SAF han sido encontradas en tejidos no nerviosos tales como el bazo de ovejas afectadas (SAG, 2003).

La detección de las SAF, indica que un animal tiene presente la proteína asociada a Scrapie y que probablemente puede ser atribuida a infección con Scrapie. Pero la ausencia de SAF no indica necesariamente que el animal este libre de la infección (SAG, 2003).

Sin embargo, esta técnica está cada día más en desuso, esto debido a su complejidad y requerimientos, por lo que ha quedado relegada al examen de material en estado de avanzada autólisis. También la inmunotinción puede aplicarse con ciertas garantías a este tipo de muestras y ambas cuando el material destinado a estudios morfológicos ha sido congelado en lugar de haber sido fijado (González, 2002).

Las pruebas diagnósticas antes nombradas, se reconocen como pruebas confirmatorias para las EETs (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Otro grupo de método diagnóstico son las denominadas pruebas “rápidas”. Estas pruebas se generaron como respuesta a la crisis de 1996, a la epidemia de las “vaca locas” y su posible diseminación al hombre, ya que hasta entonces las pruebas existentes no eran adecuadas para hacer un *screening* rápido de la población. Por lo cual se vió la necesidad de desarrollar nuevas pruebas de diagnóstico, más simples y rápidas, las que son útiles para

realizar estudios epidemiológicos a gran escala y evaluaciones más certeras de las características de la epizootia, o para pruebas rutinarias que garanticen la seguridad de las carnes animales para consumo. Esta nueva generación, se basa en la detección inmunológica de PrP<sup>Sc</sup>, el único marcador identificable responsable de las EETs (Grassi *et al.*, 2008).

Estas pruebas son de alta sensibilidad y se pueden realizar dentro de 24 horas, pero usualmente son finalizadas en unas pocas horas y son aplicadas para pruebas masivas. Por ejemplo, pueden ser usadas en matadero o en poblaciones que serán llevadas al matadero. Muchas pruebas rápidas han sido evaluadas y algunas están oficialmente aprobadas. La mayoría se basa en pruebas de ELISA o WB (Gavier-Widén *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de estas pruebas han sido evaluadas solo para EEB y no necesariamente actúan igualmente bien cuando se han aplicado en pequeños rumiantes (Bozzetta *et al.*, 2004).

***Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)***: son diversos los tipos que se han desarrollado para el diagnóstico de EETs, usando cerebro (óbex) o muestras de nódulos linfáticos. Estos tejidos son homogenizados, sometidos a un tratamiento con proteinasa K y centrifugados. El pellet es resuspendido, diluido y analizado usando un sistema ELISA. Varios anticuerpos pueden ser utilizados y una lista de empresas que suministran el anticuerpo anti-PrP ha sido publicada. La PrP<sup>Sc</sup> puede ser capturada sobre una microplaca, usando un anticuerpo anti-PrP, o alternativamente un ligando no biológico además de un segundo anticuerpo anti-PrP, asociado a varios sistemas de detección, para la PrP<sup>Sc</sup> (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

***Western immunoblot (WB)***: inicialmente los procedimientos de WB eran lentos, con varios pasos de ultracentrifugación, necesarios para purificar la PrP<sup>Sc</sup>. La prueba rápida de WB, ha sido adaptada para sustituir los pasos de ultracentrifugación por el uso de un buffer de homogenización apropiado. Que se continúa por la usual separación por electroforesis en un gel de policrilamida para ser transferida sobre una membrana, la proteína PrP anormal es detectada después de la incubación con un anticuerpo contra el fragmento de proteína resistente a proteasas, que luego se conjuga con un anticuerpo secundario. Los signos de

detección de PrP<sup>Sc</sup> generalmente involucran el uso de sustratos luminiscentes (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Sin embargo para la OIE, la técnica de IHQ es la única considerada como confirmatoria para el diagnóstico de las EETs, mientras que la técnica de ELISA es considerada como una prueba rápida, que se utiliza para análisis de la masa animal en programas de vigilancia epidemiológica (OIE, 2004b).

### **Diagnóstico preclínico.**

El diagnóstico preclínico y clínico de las EETs ha planteado la principal dificultad, puesto que las lesiones del SNC son las manifestaciones más importantes de la enfermedad. Sin embargo, la acumulación preclínica de PrP<sup>Sc</sup> encontrada en el tejido linforreticular, en algunas EETs, han dado una oportunidad para el diagnóstico temprano basándose en biopsias (muestras) de tejido linfoide periférico, tales como linfonódulos, tonsila y del tercer párpado (Tyler *et al.*, 1999; Espenes *et al.*, 2006; Doherr, 2007; González *et al.*, 2008). Estas dos características, la diseminación sistémica del agente y el largo período de incubación, teóricamente deberían favorecer la detección preclínica de animales infectados con Scrapie, a través del análisis ante-mortem, pero el éxito hasta ahora es muy limitado (González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008).

El diagnóstico ante-mortem de Scrapie de ovejas en su mayor parte, ha sido intentado en muestras de biopsia de la tonsila palatina, de tercer párpado o de los linfonodos superficiales (González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008). Estos métodos han detectado a PrP<sup>Sc</sup> en algunas ovejas subclínicamente afectadas, pero tienen inconvenientes (González *et al.*, 2006). En USA, el uso de biopsias del tercer párpado ha sido incorporado dentro del programa de erradicación, como una herramienta de monitoreo activo de los rebaños. Esta metodología, puede entregar aproximadamente un 80% de certeza en las ovejas testeadas. En la práctica, es probable que una sobrestimación de la cantidad de muestras sea muy dependiente de la experiencia del colector. Esta técnica ha demostrado tener éxito en identificar rebaños que han sido expuestos a Scrapie, pero en que la enfermedad clínica aun

no ha sido confirmada. Pueden existir falsos negativos cuando la toma de muestra ha sido inadecuada. Este puede ser un problema inherente a la edad, la raza, la oveja o a la complicación en la técnica de recolección de la muestra (Detwiler y Baylis, 2003).

Los folículos linfoides están presentes en diversos sitios a todo lo largo del intestino en las ovejas, uno de ellos es el final distal de la mucosa rectal (unión recto anal). Estos folículos se encuentran dispersos en la lámina propia y la submucosa, bajo el estrato de epitelio celular simple, lo cual los hacen accesible por medio de una biopsia (Sedgmen *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008). Espenes y colaboradores (2003), describen la detección de PrP<sup>Sc</sup> en el tejido linfoide rectal de ovejas, que habían sido infectadas experimentalmente por la vía oral (González *et al.*, 2006).

La temprana distribución de PrP<sup>Sc</sup> en el tejido linfoide no es homogénea y por consiguiente, se considera que cuando se aplica un análisis con IHQ, un número mínimo de folículos, con centros germinales, usualmente de 4 a 6, deben ser examinados para proveer un diagnóstico fidedigno (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

### **Nuevas propuestas para diagnósticos *ante mortem*.**

Se ha buscado la manera de generar nuevos marcadores de la infectividad del prión, idealmente estos debe ser detectados y expresados diferencialmente en fluidos corporales de fácil acceso, tales como la sangre u orina (Aguzzi *et al.*, 2004).

El desarrollo de estos nuevos biomarcadores no priónicos para diagnosticar EETs se ha expandido recientemente debido a los avances en las tecnologías postgenómicas, las que entregan nuevos métodos para identificar estos posibles biomarcadores (Parveen *et al.*, 2005).

Existen otros marcadores tales como S-100, enalasa neuro-específica y la proteína 14-3-3, lo que se han sugerido como potenciales biomarcadores de la enfermedad priónica, usando fluidos corporales como el líquido cerebroespinal (LCR). Sin embargo hay que aclarar que

estos marcadores son en general, marcadores de enfermedades neurodegenerativas y no son de ningún modo predictores para una enfermedad priónica (Aguzzi *et al.*, 2004).

El diagnóstico de las enfermedades producidas por priones depende principalmente de la detección de la forma anormal de PrP (PrP<sup>Sc</sup>). Este acercamiento, fue útil como reacción a la epizootia de EEB y en las bases de la vigilancia activa para las EETs en rumiantes, pero hasta el momento no se han encontrado pruebas que cumplan con todos los requerimientos para el diagnóstico de enfermedades producidas por priones. Hasta ahora, ninguna prueba puede dar un diagnóstico confiable usando una muestra fácilmente disponible de una persona o animal vivo, como sangre u orina (Grassi *et al.*, 2008). Algunos ejemplos de estas nuevas propuestas son:

- La posibilidad de detectar PrP<sup>Sc</sup> desde la placenta, generándose la factibilidad de usar estos tejidos como una prueba preclínica de Scrapie (Detwiler y Baylis, 2003; Caplazi *et al.*, 2004).
- La confirmación de la infectividad del Scrapie en la sangre, entrega una gran posibilidad de encontrar un nuevo método diagnóstico preclínico, haciendo uso de muestras de sangre. La electroforesis por capilaridad (EC), ha mostrado ser prometedora. El método involucra ensayos de competencia por PrP<sup>Sc</sup> usando péptidos marcados con fluorescencia, los que fueron obtenidos de PrP y anticuerpos específicos hacia los péptidos. Otros estudios están también en progreso para explorar metodologías adicionales para la detección de PrP<sup>Sc</sup> en sangre o la posibilidad de usar marcadores sucedáneos para la enfermedad (Detwiler y Baylis, 2003). Además existe evidencia de que algunos leucocitos circulantes podrían estar asociados con la infectividad (Parveen *et al.*, 2005).
- Se ha reportado la detección de PrP<sup>Sc</sup> en orina de animales infectados con EETs, la que podría ser una muestra posible para pruebas diagnósticas (Detwiler y Baylis, 2003).
- Grassi *et al.*, (2008) plantean nuevos enfoques para estas pruebas ante mortem, consideran que no existen pruebas que puedan dar un diagnóstico fidedigno a partir de

muestras fácilmente extraíbles, tal como una muestra de sangre o de orina. Así, exponen la búsqueda de marcadores alternativos, los cuales se basan en el desarrollo de acercamientos postgenómicos, que pueden ser usados paralelamente a una amplia gama de análisis de las transcriptomas, proteoma y a una serie de pequeños metabolitos de tejido. Especial atención tiene los marcadores neuronales, los que incluyen la proteína 14-3-3, enolasa (fosfo-piruvato dehidratasa) específica de neurona, la proteína S100B, la proteína acidica fibrilar glial (GFAP), la proteína Tau, apolipoprotina E. Sin embargo, ninguno de estos marcadores han demostrado ser útiles como una base para análisis suficientemente sensibles y específicos que permitan el diagnóstico preclínico temprano. Estos marcadores también han sido reconocidos en estudios realizados por Parveen (2005) y colaboradores.

- Marcadores metabólicos como el ácido graso unido a proteína, interferón  $\gamma$ , prostaglandina E<sub>2</sub>, proteína C reactiva, interleucina 6, cistatina C y marcadores metabólicos como los corticosteroides, también han sido estudiadas pero sin éxito (Detwiler y Baylis, 2003; Parveen *et al.*, 2005).

- Estudios transcriptómicos han revelado potenciales marcadores transcripcionales, es así como se reportó la expresión diferencial de un gen extraneural durante la infección priónica, conocido como: Factor Relacionado a la Diferenciación Eritroide (FRDE, también conocido como factor eritroide asociado). Sus niveles fueron reduciendo progresivamente en el bazo del ratón infectado con el prión durante la patogénesis, así como también en la sangre de ratones infectados experimentalmente, bovinos con EEB y ovejas que manifestaron sintomatología de Scrapie. Es importante definir los rango normales de expresión de este marcador (según edad, sexo, etc) para poder determinar lo que representa un nivel anormal (Aguzzi *et al.*, 2004; Parveen *et al.*, 2005).

- Algunos grupos han desarrollado análisis basados en el suero, por medio de la espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR) combinada con datos procesados por métodos de trabajos neuronales. Este acercamiento, muestra una alta sensibilidad (>90%) y especificidad en ganado bovino, pero se duda de su uso bajo condiciones rutinarias, como marcador temprano para el diagnóstico de las EETs (Detwiler y Baylis,

2003; Parveen *et al.*, 2005). Se informó que esta prueba es sensible y específica (97% y el 100%, respectivamente), pero no se sabe si los cambios detectados por FTIR son específicos a las EETs o si se debe a bacterias, organismos virales, hongos o parásitos. Los análisis por FTIR ha demostrado ser útil para discriminar cepas de la PrP patológica entre el Scrapie y la EEB, la identificación de cambios en las proteínas estructurales en los ganglios nerviosos de hámsters infectados y el tejido cerebral de animales infectados con EET. Queda por demostrar cómo poco después de la infección con EET, esta puede ser detectada por el análisis FTIR de los sueros y los efectos de la edad, el sexo, la raza y la alimentación tienen en la especificidad de la prueba (Parveen *et al.*, 2005).

- La amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) para facilitar la detección preclínica del prión en tejidos periféricos, principalmente en sangre. La PrP<sup>Sc</sup> de la muestra es amplificada por medio de una PMCA, que busca imitar el proceso patológico y es similar a la reacción en cadena de la polimerasa usada para amplificar el DNA (pero con adición de una enzima polimerasa exógena), la PrP<sup>Sc</sup> es incubada en presencia de exceso de PrP<sup>C</sup>, para permitir la expansión de agregados de PrP<sup>Sc</sup> que se dispersan por electrosonido, para así generar pequeñas unidades y la formación de nuevos agregados. La cantidad de PrP<sup>Sc</sup> formada depende del número de ciclos de expansión /electrosonido realizados. La PrP<sup>Sc</sup> formada por PMCA tiene todas las propiedades de la PrP<sup>Sc</sup> original, principalmente su carácter infeccioso (Grassi *et al.*, 2008).

La PMCA es ciertamente una propuesta promisoriosa para el desarrollo de pruebas sanguíneas, aunque se dificulta por varios fundamentos y problemas técnicos. Para adaptarla a los análisis de rutina, es necesaria su simplificación, reducción del tiempo y un mejor control. Además, una desventaja práctica muy importante es el requerimiento obligatorio de una fuente concentrada de PrP<sup>C</sup> (extracto de cerebro o PrP<sup>C</sup> purificada) de la misma especie como marcador para ser amplificado; estos problemas específicos se podrían resolver por el uso de PrP recombinante y acelerar el proceso, asumiendo que el modelo obtenido en hámster se puede extender a otras especies mamíferas (Grassi *et al.*, 2008).

## **Prevención, control y erradicación.**

Si se desea eliminar el Scrapie tanto dentro de un rebaño así como a nivel de país, es esencial identificar los factores de riesgos asociados a su diseminación. Estudios epidemiológicos y modelos matemáticos han comenzado a ser utilizados para complementar las investigaciones sobre la transmisión directa y la patogénesis de la enfermedad, estos han demostrado que el movimiento de animales, el tamaño del rebaño, las prácticas de cruzamiento y los manejos de partos, son algunos de los factores que parecen influenciar la introducción y diseminación del Scrapie en los rebaños (Detwiler y Baylis, 2003). Por consiguiente, el principal modo de transmisión del Scrapie es, la excreción del agente infeccioso mediante la incubación de las hembras durante el parto. Esto genera la contaminación del medio ambiente, la posterior infección de los corderos, pero también de otros compañeros del rebaño (transmisión horizontal), y de larga duración "típica" de los ciclos epidémicos debido al largo período de incubación y la prolongada supervivencia del agente en el medio ambiente (Doherr, 2007).

Otro factor de riesgo importante en la introducción del Scrapie es la incorporación inadvertida de ovejas en etapa preclínica de la enfermedad, a través de la compra de animales para reproducción. Además, el compartir praderas o carneros, las crías y los manejos durante el parto, también se han identificado como factores de riesgo (Detwiler y Baylis, 2003).

Otros factores que influyen la mantención y transmisión del Scrapie dentro del rebaño son los siguientes:

- Cantidad y duración de excreción del agente, los que dependen del periodo de incubación, la vida útil del animal y el posible estado de preñez de la oveja. Si el ambiente sirve como una fuente de infección, exposición y de mantenimiento esto puede ser prolongado dependiendo de la sobrevivencia del agente (Detwiler y Baylis, 2003).

- El número de ovejas genéticamente susceptibles dentro del rebaño, el que puede ser resultado del reemplazo por razas susceptibles, tanto compradas como por cruza reproductivas (Detwiler y Baylis, 2003).

La emergencia de una nueva variante de CJD (vCJD) relacionada al consumo de carne contaminada con EEB en 1986 y la posterior transmisión experimental de la EEB a ovejas y cabras, han llevado a otros países endémicos para Scrapie, a iniciar programas para eliminar la enfermedad. Los enfoques de los programas de erradicación y control de Scrapie que han sido utilizados los últimos años, apuntan hacia lo siguiente (Detwiler y Baylis, 2003; Bozzetta, 2004):

- Eliminación completa de rebaños infectados.
- Despoblación de animales genéticamente asociados a la enfermedad.
- Eliminación de animales en riesgo, basándose en la sospecha de las vías de transmisión, como es el grupo de animales en periodo de parición.
- Despoblación únicamente de animales afectados.
- Limpieza y desinfección del predio.
- Un periodo durante el cual las especies susceptibles no pueden reingresar al predio.
- Usos de programas para seleccionar las razas y cruzamientos, basándose en los genotipos priónicos.

El método ideal para prevenir la introducción del Scrapie a una zona o país libre, es mantener los rebaños protegidos y aislados, especialmente en relación a las hembras preñadas. Cualquier hembra de reemplazo o macho para reproducción, debe provenir de rebaños que se saben libres de la enfermedad y que poseen prácticas de manejo destinadas a prevenir la introducción de la misma. En la práctica, esto es difícil de garantizar, debido a la inexistencia de una prueba diagnóstica *in vivo* definitiva, que asegure la ausencia de la enfermedad. Pero si es posible mantener identificado a ese animal, por programas de estudio selectivo realizado mediante biopsias de tercer párpado o de tonsilas, que permitan establecer el estado sanitario de un rebaño determinado para esta enfermedad, aumentando así la valoración comercial de dicho rebaño (Detwiler y Baylis, 2003).

A pesar de la carencia de una prueba diagnóstica definitiva en animales vivos, hay algunos pasos preventivos que el comprador potencial de animales puede tomar: informarse acerca del estado sanitario del rebaño de donde provienen los animales; si el estado sanitario es desconocido, entonces se sugiere realizar cuarentenas; contemplar estudios de genotipos, para favorecer la presencia de animales resistentes a la enfermedad; si el rebaño desarrolla la enfermedad, se debe minimizar el riesgo de una posterior diseminación o reintroducción de la misma, para conseguir esto se deben separar los animales en riesgo, realizar limpiezas y desinfección cuidadosa de las dependencias, mejorar el manejo de los partos y segregar los animales en pequeños grupos. Además, las membranas fetales junto con la placenta deberían ser removidas inmediatamente, ya que las ovejas tienden a lamerlas y la cama debería cambiarse entre los alumbramientos. En algunos países el método de control consiste en la eliminación completa del rebaño afectado, así como también de aquel desde donde provenían estos animales. Por último, aunque no se ha comprobado la participación de las Harinas de Carne y Hueso (HCH), contaminadas con el agente de Scrapie en la transmisión del mismo, en países en donde la enfermedad es endémica o se ha detectado al presencia de otra EET, se recomienda prohibir la alimentación de ovinos y caprinos con HCH de rumiantes (Detwiler y Baylis, 2003; OIE, 2007a).

El agente del Scrapie es altamente resistente a los desinfectantes, el calor, la radiación ultravioleta, o ionizante y la formalina. La desinfección efectiva es posible con un autoclavado a 134-138°C por 18 min. Los tejidos contaminados deberían ser autoclavados bajo las mismas condiciones o incinerados. Para la desinfección de equipos, se recomienda el hipoclorito de sodio al 2 % de cloro y el hidróxido de sodio (2 N) que son desinfectantes químicos efectivos, que deberían ser aplicados por más de una hora a 20°C (OIE, 2007a).

### **Salud Pública.**

Las encefalopatías espongiformes transmisibles constituyen un grupo de enfermedades desafiantes científicamente de baja prevalencia en distintas especies. Debido a la transmisibilidad de la EEB a otros hospederos, incluidos los seres humanos (vCJD) (Fournier y Grigoriev, 2001; Doherr, 2007) y el hecho de que se trata de una enfermedad

que afecta el "cerebro", sin embargo, a pesar de su baja incidencia en general, ha comenzado a llamar la atención del público, de los profesionales de la salud pública (veterinarios) y de los políticos. Dentro del esfuerzo para controlar la EEB, junto con las EETs de los pequeños rumiantes, los vastos recursos fueron destinados a la monitorización de los programas y el control relacionados con los cambios en las respectivas industrias (Doherr, 2007).

Aún cuando el Scrapie se ha presentado en ovinos y caprinos europeos por décadas y que durante los últimos 200 años, se haya reportado su existencia en cada continente donde se críen ovinos. Su relevancia sólo se vio incrementada a partir del año 1980, cuando por diversos factores se produce la difusión del conocimiento de las EETs. Un factor determinante en este acontecimiento es la epidemia de EEB, ocurrida en el Reino Unido, la que se relacionó con el consumo de alimento concentrado para vacunos elaborado con HCH provenientes de ovejas y cabras contaminadas con Scrapie. Otro factor importante, fue el reconocimiento de la vCJD en el humano y su relación con la exposición al agente de la EEB, mediante el consumo de alimentos cárneos contaminados con priones. Esta posibilidad de transmisión, se reafirmó al observar que los primeros casos de vCJD se restringieron casi exclusivamente al Reino Unido, lugar donde simultáneamente ocurría la epidemia de EEB (Bozzetta, 2004; Aguzzi, 2006; Bravo, 2008).

Hasta la fecha, no se ha demostrado evidencia científica ni epidemiológica que indique riesgo directo hacia los humanos por el consumo de productos cárnicos ovinos, en contraste a lo que ha ocurrido con la EEB, enfermedad que se ha transmitido a gatos domésticos y a seres humanos, por el consumo de productos contaminados (González, 2002; Detwiler y Baylis, 2003; Bravo, 2008; Madariaga, 2009).

A pesar de que sólo se ha demostrado experimentalmente la transmisión con EEB en ovinos, la posibilidad de que ésta ocurra significa un gran riesgo, tanto para la población ovina como humana, ya que la patogenia de la EEB en la oveja es diferente a la que ocurre en la vaca, lo que se observa en la diseminación de la infección. En bovinos infectados con EEB, la infectividad está primariamente limitada al SNC, mientras que en los ovinos, ésta

se disemina a través de todo el sistema linforetico, por lo tanto, la PrP<sup>Sc</sup> estaría presente en la carcasa completa. Además, se ha demostrado la capacidad de transmisión de la EEB desde la oveja a la cría vía placenta (van Keulen *et al.*, 2008b).

De acuerdo a esto, sería un error dejar de investigar acerca de este tema, ya que la posibilidad de que la EEB sea transmitida hacia un ovino y éste a su vez la transmita a un humano, aún no ha sido desechada (Detwiler y Baylis, 2003; van Keulen *et al.*, 2008b).

### **Situación Nacional.**

Según el “Informe anual de salud animal para la notificación de la ausencia o presencia de todas las enfermedades” entregado por la OIE, correspondiente al periodo de enero a diciembre del año 2007, en Chile no se han descrito casos de Scrapie. Sin embargo, se establece que si se llegasen a presentar casos, estos se deben declarar obligatoriamente (OIE, 2007b).

El organismo encargado de instaurar y mantener medidas sanitarias frente a enfermedades de carácter exótica (cuando ésta no existe en el país, ya sea porque nunca estuvo presente o porque fue erradicada), es el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), autoridad oficial de Sanidad Animal (Madariaga, 2009).

La vigilancia de enfermedades de animales es un importante componente del programa de trabajo anual de la división de protección pecuaria, cuyo objetivo es mantener la vigilancia de las enfermedades animales notificables tal que permita verificar la condición sanitaria, disponer de un mecanismo de detección temprana de aquellas que son exóticas y monitorear cambios en patrones de ocurrencia en aquellas presentes en el país (SAG, 2010).

El hecho de que una de las hipótesis planteadas acerca del origen del brote de EEB, es que este surgió a partir de una nueva cepa de Scrapie, sumado a nuevos estudios que plantean la posibilidad de que el agente de la EEB sea transmitido a los ovinos, como se ha demostrado

bajo condiciones experimentales, junto con la vinculación directa entre la vCJD de los humanos y la EEB de los bovinos, convierten al Scrapie en una amenaza potencial para la salud humana (Detwiler y Baylis, 2003). Si bien la presencia de Scrapie no ha sido confirmada en el país, las medidas que toma el SAG para su prevención y control son (SAG, 2010):

- Vigilancia dirigida a los animales susceptibles en zonas en las cuales el beneficio de ovinos adultos es mayor al 6% del total nacional.
- Vigilancia de los ovinos adultos (ovejas y carneros). Este muestreo se dirige a los predios ovinos de todo el país, campos de pastoreo cordilleranos desde Coquimbo hasta la Araucanía y mataderos de regiones de Aysén y Magallanes.
- El muestreo es dirigido a todos los ovinos con signos clínicos compatibles con Scrapie detectados en predios y campos de pastoreo cordilleranos, así como a ovinos caídos, mortecinos y sacrificados de emergencia en mataderos.
- El tamaño de muestra es de 6 ovinos adultos para la región de Aysén y 143 ovinos para la región de Magallanes.
- La muestra a recolectar corresponde a la cabeza del animal.
- La prueba de laboratorio a emplear es la técnica diagnóstica de ELISA.

Con respecto a la EEB, en mayo del 2006, Chile fue reconocido como país provisionalmente libre de EEB por el Comité Internacional de la OIE, sobre la base del Código Sanitario para los Animales Terrestres del año 2004 (SAG, 2006). Actualmente, Chile ha sido reconocido como país con riesgo insignificante de EEB (OIE, 2010).

En cuanto al rubro ganadero ovino, el país tiene un gran potencial para crecer, debido a las condiciones de sus praderas y a la disponibilidad de infraestructura, como mataderos, desde la zona centro hasta Magallanes, sumado al nivel actual de precios, tanto en el ámbito nacional como internacional, que ha hecho renovar vigorosamente el interés en el desarrollo del rubro.

Es por esto que se hace importante encontrar nuevas formas para diagnosticar el Scrapie preclínicamente y validar estas técnicas en el país, ya que permitirían la implementación de programas de vigilancia para esta EET, tanto en animales que ingresen al país para mejorar el ganado presente, como para establecer un estado sanitario libre de Scrapie en la masa ovina chilena, lo que abriría las puertas a más mercados internacionales, favoreciendo aún más el desarrollo de este sector ganadero. Es por esto que, los objetivos de esta memoria apuntan a ello.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Detectar por medio de inmunohistoquímica (IHQ) la presencia de proteínas priónicas en el tejido linfoide obtenido de la mucosa rectal de ovinos *post mortem*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Estandarizar la ubicación anatómica para la obtención de tejido linforreticular, en muestras de la mucosa rectal de ovinos *post mortem*.

Evaluar la aptitud de las muestras, mediante la tinción de Hematoxilina y Eosina (H/E), de acuerdo con el número de centros germinales observados en los cortes, necesarios para el diagnóstico.

Validar la utilización de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) en muestras de tejido rectal de ovinos *post mortem* para la detección de proteína priónica.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

La recepción, procesamiento y análisis de los tejidos utilizados se realizó en la unidad de Patología del Departamento Laboratorio y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria “Lo Aguirre” del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG). Este laboratorio cuenta con normas de bioseguridad tipo 2, necesarias para manipular y procesar este tipo de muestras.

### **A. Estandarizar la obtención de tejido linforreticular, en muestras de la mucosa rectal de ovinos *post mortem*.**

Las muestras que se sometieron a este estudio corresponden a tejido linfoide ubicado en la porción terminal del recto, obtenido de ganado ovino mayor de 2 años, proveniente de mataderos ubicados en Punta Arenas (XII, Duodécima Región de Magallanes y la Antártica chilena). Se muestrearon un total de 54 individuos.

Los trozos de recto se obtuvieron mediante el uso de tijeras de disección, con las cuales se realizó un corte a 4 cm craneales al ano. Estos segmentos se fijaron y mantuvieron en formalina neutra 10% y se enviaron en frascos cerrados previamente rotulados. Una vez recepcionada las muestras en el Laboratorio de Patología del SAG, se laminaron a distintas distancias (Fig. 6) desde la línea recto anal (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 cms), con el propósito de definir la zona óptima de muestreo. Los cortes se colocaron en *cassettes* histológicos e identificaron con un número en la parte frontal y otro en la cara lateral, según fueron recepcionados y de acuerdo a la distancia de corte respectivamente. Luego se mantuvieron en formalina neutra (formalina al 10%) por una semana.



**Figura N° 6:** fotografía del recto ovino. Los Alfileres indican las distintas distancias desde la línea recto anal que se seleccionaron para este estudio.

Pasado este tiempo, las muestras se retiraron de la formalina y fueron sometidas a deshidratación y aclaramiento, en un procesador de tejidos automático (LEICA TP1020). Se eligió un programa (Anexo 1), que secuencialmente sumerge los tejidos en alcohol en graduación creciente, luego en xilol y posteriormente en parafina. La duración total del proceso es de 16 h.

Utilizando un centro de inclusión (LEICA EG1160), las muestras fueron incluidas en bloques de parafina, dejando hacia la superficie de corte del micrótopo el extremo correspondiente a la distancia seleccionada desde la línea recto-anal. Se realizaron cortes histológicos de 4-5  $\mu\text{m}$  de grosor, en un micrótopo (LEICA RM2145). De cada bloque se obtuvieron cortes seriados, los cuales fueron montados en 2 portaobjetos: uno, que fue teñido con el método de Hematoxilina/Eosina (H/E), para el análisis histopatológico y la evaluación de la aptitud de la muestra y el otro en el cual se realizó la técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

## **B. Evaluar la aptitud de las muestras, mediante la tinción H/E, en relación a la observación del número necesario de centros germinales para el diagnóstico.**

El primero de los cortes de cada muestra, fue puesto en un portaobjeto previamente desengrasado, cubierto con una capa de albúmina de Mayer como medio adherente; llevando el portaobjeto a una estufa a 37°C durante 30 min. Luego se distribuyeron los portaobjetos en un canastillo y fueron sometidos a calor en una estufa (THELCO 31608) a 60°C durante 30 min y en seguida se mantuvieron a 37°C durante toda la noche en una estufa de secado (ELCONAP B-1-P).

Posteriormente, los tejidos fueron sometidos a baños de xilol, de alcoholes en graduación decreciente, para su posterior hidratación (Anexo 2) y a continuación a la tinción con H/E (Anexo 3). Una vez terminados estos pasos, se procedió al montaje de la preparación, para lo cual se extrajo el portaobjetos del último xilol (baño de aclaramiento), se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio.

Previo a la realización de la técnica de IHQ, las muestras fueron observadas en un microscopio óptico (Nikon HFX-DX), para describir las estructuras presentes. Se evaluó la aptitud de la muestra de acuerdo a la presencia en cantidad, de folículos linfoides con centros germinales. La clasificación como apta o no apta, dependió del número de centros germinales observados, así para designar una muestra como apta se debieron observar a lo menos 4 centros germinales en ella después de realizar la tinción, puesto que para un diagnóstico correcto es necesario observar un número mínimo de 4 centros germinales en los folículos linfoides, que deben ser examinados por inmunohistoquímica para proveer un diagnóstico certero, así para determinar una muestra como negativa por la técnica de IHQ, es necesario que al menos existan 4 centros germinales y que en ninguno de estos se presente reacción de inmunotinción (González *et al.*, 2008).

### **Análisis de las muestras:**

- Apta: aquella en que a la observación microscópica, es posible identificar a lo menos 4 centros germinales posterior a la tinción de H/E.

- **No apta:** cuando a la observación microscópica, se identifiquen menos de 4 centros germinales mediante la tinción por H/E.

Para determinar si existe cierta diferencia estadística entre los cortes de la mucosa rectal a las distintas distancias desde la línea recto anal y su calidad de apta o no para realizar la IHQ, se utilizó la prueba no paramétrica de *chi cuadrado* ( $\chi^2$ ), la que se aplicó de manera global y comparando la distribución entre pares de grupos de distancia de toma de muestra. Este estadígrafo se utilizó de forma manual, usando los recursos que entregan las planillas Excel de Microsoft.

### **C. Detección de la proteína priónica, a través de la técnica de inmunohistoquímica en la mucosa rectal de ovinos.**

Una vez que se clasificaron la muestra a través de la tinción de H-E, aquellas que se consideraron como aptas se sometieron a la técnica de IHQ, para esto se utilizó el corte homólogo de la muestra que fue depositada en un portaobjeto ProbeOn Plus FisherBiotech®, que poseen carga eléctrica que mejora la adherencia. Además, estos cortes se posicionaron verticalmente sobre papel absorbente con el propósito de eliminar el exceso de agua bajo el tejido, hasta que no existiera evidencia de la presencia de esta, excluyendo del procesamiento la utilización del secador de portaobjetos (Bravo, 2008). Posteriormente, los portaobjetos se sometieron a calor en una estufa (Thelco 31608) durante 1 h a 60°C y luego durante toda la noche a una estufa de secado (labtech LDO – 100E) a 37°C.

A continuación, estos tejidos fueron sometidos a baños de xilol y alcohol en graduación decreciente para su posterior hidratación (Anexo 4). Inmediatamente se realizó el protocolo de inmunohistoquímica que resumidamente se describe a continuación, en el que se utilizaron controles positivos y negativos de mucosa rectal y óbex provenientes de Canadá, Ontario, del Nacional Referente Laboratory for Scrapie and CWD, Animal Research Institute, Canadian Food Inspection Agency:

- Bloqueo de peroxidasa endógena: debido a que esta técnica utiliza un método de marcaje con peroxidasa, fue necesario inhibir la actividad endógena de esta enzima sobre el tejido en estudio. Para ello, se preparó una solución de agua oxigenada al 3% en metanol absoluto, en la cual se mantuvieron las muestras por 10 min. A continuación los portaobjetos fueron sumergidos en agua bidestilada para retirar restos de la solución utilizada anteriormente.

- Activación antigénica de tejido: las muestras se incubaron en ácido fórmico al 98% durante 5 min a temperatura ambiente, con el propósito de descontaminar los tejidos y aumentar la sensibilidad a la inmunotinción. Se lavaron, seguido de una incubación en una solución tampón fresca por 2 min. Manteniendo el pH de la solución entre 7 y 8 unidades. Luego fueron transferidas a una solución recuperadora de antígenos pH 7,6 (Target Retrieval Solution®), para incubarlas en un autoclave durante 20 min a 120°C. Los portaobjetos se dejaron enfriar en la misma solución a temperatura ambiente.

Una vez frías, las muestras fueron incubadas en una solución de TBST pH 7,6 (Tris Buffer Salino-Tween 20) por 10 min. Los portaobjetos fueron colocados en un sostenedor de portaobjetos (Slide Holder, FisherBiotech®) de manera pareada con las caras pintadas en contacto, de tal manera que se formara un espacio de capilaridad entre ambos. Una vez montados en el sostenedor, se comenzó a realizar la técnica de Inmunohistoquímica, siguiendo el protocolo del *kit* (Pullman Monoclonal F99/97.6.1).

### **Inmunotinción:**

1. *Tratamiento con proteinasa K*: se agregaron 180 µL de solución de proteinasa K en cada pocillo de un dosificador de goma (Isolon®) para cada par de portaobjetos. Se incubaron por 90 seg a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 3 lavados con TBST pH 7,6, de 20 seg cada uno.

2. *Tratamiento con anticuerpo primario monoclonal*: en cada pocillo del dosificador, se agregaron 180µL de una solución del primer anticuerpo monoclonal F99/97.6.1 (dilución

1:1000), las muestras fueron incubadas durante 15 min a 37°C, seguido de 3 lavados con TBST pH 7,6, de 20 seg cada uno.

3. *Tratamiento con anticuerpo secundario policlonal biotinilado:* en cada pocillo del dosificador, se agregaron 180µL de una solución del segundo anticuerpo policlonal anti-ratón biotinilado, las muestras fueron mantenidas durante 10 min a temperatura ambiente, luego se realizaron 3 lavados con TBST pH 7,6, de 20 seg cada uno.

4. *Tratamiento con streptavidina – HRP:* en cada pocillo del dosificador, se colocaron 180µL de streptavidina conjugada con HRP peroxidasa (Horseradish Peroxidase), las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con TBST pH 7,6, de 20 seg cada uno.

5. *Revelado de la reacción inmunológica con sustrato de cromógeno AEC:* para poner de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo, las muestras fueron incubadas con el sustrato de cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol). Por lo tanto, el reactivo se dispuso en cada pocillo del dosificador. La incubación se realizó por 20 min (divididas en 2 incubaciones de 10 min, utilizando 180µL del sustrato en cada incubación) y protegida de la luz directa.

6. *Tinción de contraste:* para la tinción del tejido, se incubaron las muestras con hematoxilina de Meyer's (Dako®) durante 30 seg. Luego fueron retiradas del sostenedor y reubicadas en un canastillo, donde se realizó un lavado suave con agua corriente. Los portaobjetos se dejaron en agua hasta el momento de realizar el montaje de los cubreobjetos, con un medio acuoso permanente (Faramount, Dako®).

#### **Análisis de las muestras:**

La tinción positiva del tejido linfoide de la mucosa recto anal, se reconoció por una fuerte inmunotinción citoplasmática particulada en los centros germinales de los folículos linfoides. La muestra que no cumplía con los requerimientos en número de centros germinales, fue clasificada como una muestra de tejido linfoide insuficiente para la determinación de la PrP<sup>Sc</sup>.

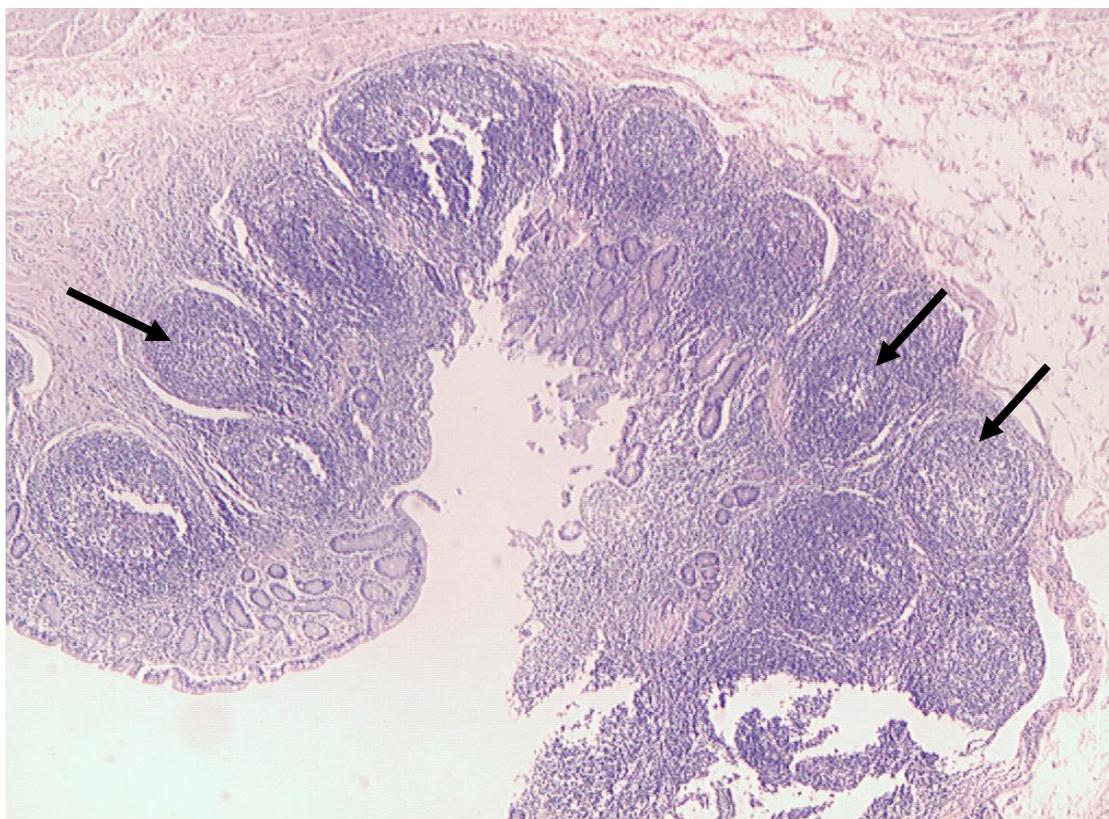
- Muestra positiva: fueron considerada aquellas en que uno o más de los folículos mostraron un precipitado granular rojo, coincidente con la inmunotinción mencionada anteriormente.
- Muestra negativa: cuando no se observó inmunotinción del tejido, siempre que la muestra presentara el mínimo de 4 centros germinales requeridos para el diagnóstico.

De todas las muestras que se analizaron, se fotografiaron y describieron aquellas clasificadas como aptas para este estudio, así como también algunas de las muestras clasificadas como no aptas. Para esto se utilizaró un microscopio Axio Imagen A1 (Zeiss), el cual va unido a una cámara fotográfica digital (Canon PowerShot G6).

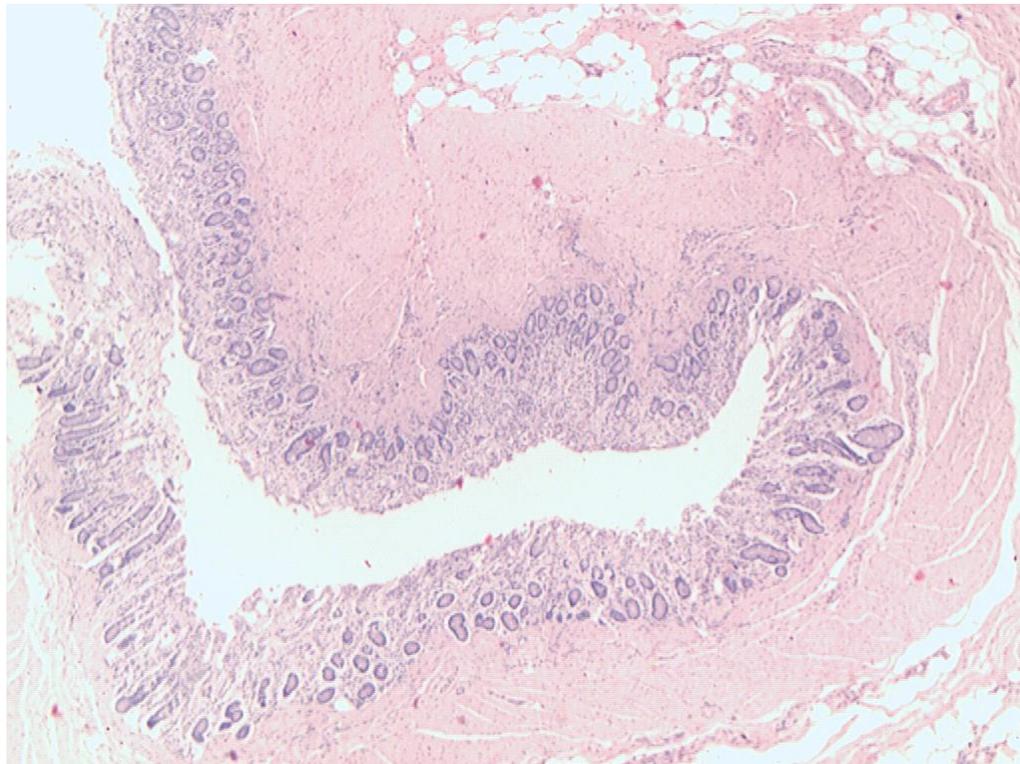
## RESULTADOS.

De los 54 ovinos muestreados se obtuvo un total de 270 cortes, los cuales fueron sometidos a la técnica H/E y posterior observación microscópica, lo que permitió evaluar su aptitud, clasificándolas en muestras aptas y no aptas.

Se consideraron como aptas, aquellas que presentaron un número mayor o igual a 4 centros germinales en el tejido linfoide de la mucosa rectal (Figs. 7 y 8), las que posteriormente se sometieron al protocolo de inmunohistoquímica (IHQ). En la figura 7 se presenta como ejemplo una de las muestras clasificadas como aptas y en la figura 8 un corte de los clasificados como no apto.



**Figura N° 7:** microfotografía de un corte histológico de la mucosa de recto ovino, que corresponde a una muestra apta. Las flechas indican diversas áreas circulares con centros pálidos que corresponden a los centros germinales del tejido linfoide (H/E 40X).

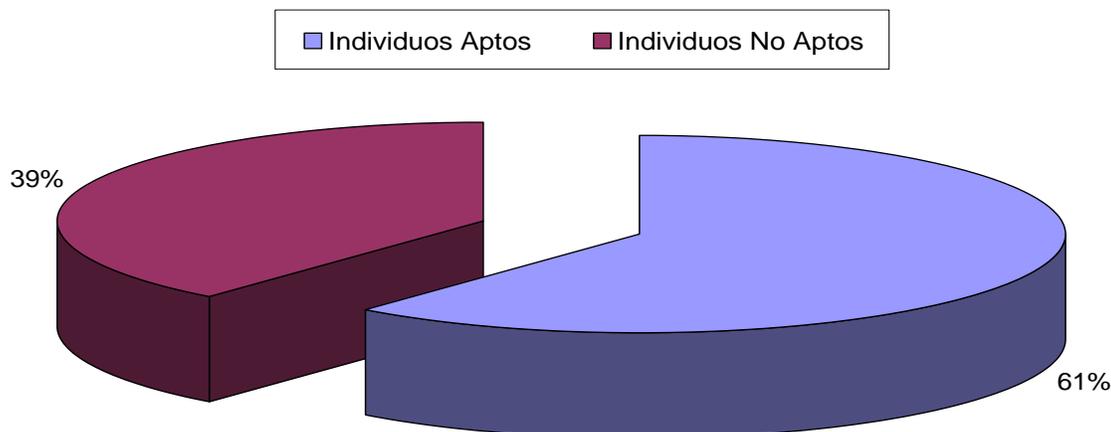


**Figura N° 8:** microfotografía de un corte histológico de la mucosa de recto ovino. En este caso corresponde a una muestra no apta, puesto que no se observan centros germinales (H/E 40X).

Así del análisis microscópico de los 54 individuos. En 33 de ellos, se observó que al menos una de las cinco muestras fue considerada apta y 21 no presentaron muestras aptas en ninguno de sus cortes (Anexo 5). Sin embargo, en términos de individuos, 33 que fueron aptos para realizar el diagnóstico de Scrapie por la técnica de IHQ, los que corresponden al 61 % del total de los muestreados (Gráfico 1). Además, de los 33 ovinos ninguno reunió los cinco cortes aptos para IHQ; pero 3 individuos presentaron 4 de las muestras aptas; 9 mostraron 3 cortes aptos, 14 con 2 secciones aptas y 7 individuos al menos tuvieron 1 corte apto (Gráfico 1).

**Gráfico N° 1.**

**Porcentaje de muestras Aptas y No Aptas del total de 54 Individuos**



En la siguiente tabla (N° 4) se describe la distribución del total de las muestras analizadas por H/E en las diferentes distancias desde la línea recto anal estudiadas. Del total de las muestras (5) por individuos (54), se obtuvieron 270 cortes, de los cuales 74 fueron clasificados como aptos para IHQ y 196 no lo fueron

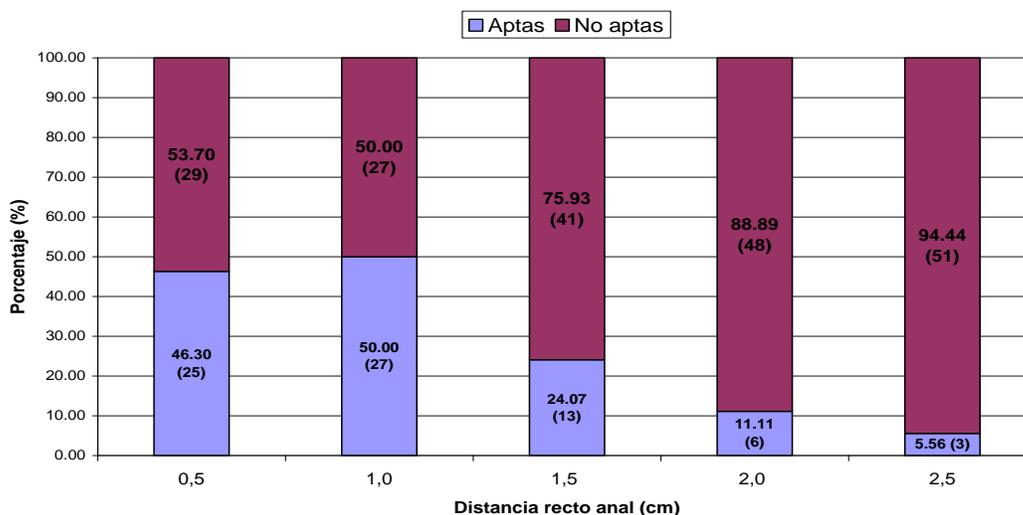
**TABLA N° 4. Número de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a distinta distancia desde la línea recto anal**

	<b>0, 5cm.</b>	<b>1cm.</b>	<b>1, 5cm.</b>	<b>2cm.</b>	<b>2, 5cm.</b>	
Aptas	25	27	13	6	3	74
No aptas	29	27	41	48	51	196
Total	54	54	54	54	54	270

En el gráfico 2, se muestra la distribución porcentual junto con el valor total respectivo de los cortes, a las diferentes distancias de la línea recto anal y comparativamente de cada una de ellas, tanto para muestras aptas como no aptas.

## Grafico N° 2.

Distribucion porcentual de las muestras aptas y no aptas a las distintas distancias de la línea recto anal



El análisis del gráfico previamente mostrado, permite deducir que la mayoría de las muestras aptas están agrupadas entre los cortes de 0,5cm (46, 3%) hasta 1,5cm (24, 07%) de distancia desde la línea recto anal, correspondiente a la zona más caudal del recto. Así también, se puede evidenciar que el mayor número de muestras no aptas se agruparon en los cortes obtenidos entre los 2cm (88, 89%) y 2,5cm (94,44%) de distancia desde la línea recto anal, correspondiendo esta a la zona más craneal al recto.

### Análisis Estadístico.

De las muestras observadas por medio de la técnica de H/E, se obtuvo un total de 74 cortes aptos para realizar los protocolos de IHQ y 196 que no lo eran. Para analizar los datos obtenidos de la toma de muestra a las distintas distancias de la línea recto anal, se aplicó la prueba estadística de *chi cuadrado* ( $\chi^2$ ) (Taucher, 1997). Esta prueba no paramétrica se utilizó tanto a nivel general, así como para comparar la distribución entre pares de distancia (Anexos 6 y 7).

Con una probabilidad de 0,05 y 4 grados de libertad, se tiene una distribución de  $\chi^2$  crítico igual a: 9,4877. Dado que el valor obtenido en la prueba  $\chi^2$  global (Anexo 6) es mayor que

esta distribución (44, 007) se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto el porcentaje de folículos aptos para IHQ es diferente por lo menos en dos de las distancias.

Para comparar las distancias de toma de muestras empleadas, estas se agruparon por pares (Anexo 7), obteniendo así 10 combinaciones, las que, con un  $\chi^2$  crítico = 10,8 (un nivel de significancia igual a  $\alpha= 0,001$  y 1 grado de libertad); entregó el resultado resumido en la tabla 5. Es así como se observa que no hay diferencia en relación a la obtención del número de folículos suficientes para determinar la muestra como apta para IHQ entre las distancias 0,5 y 1cm.; 0,5 y 1,5cm.; 1 y 1,5cm; 1,5 y 2cm; 1,5 y 2,5cm; 2 y 2,5cm. En cambio, entre las distancias 0,5 y 2cm.; 0,5 y 2,5cm.; 1 y 2cm.; 1 y 2,5cm, si se aprecian diferencias en la obtención del número de folículos y por tanto de muestras aptas para IHQ.

**TABLA N° 5. Comparación de pares de grupos de las distintas distancias de obtención de muestras, mediante la prueba de *chi cuadrado* ( $\chi^2$ )**

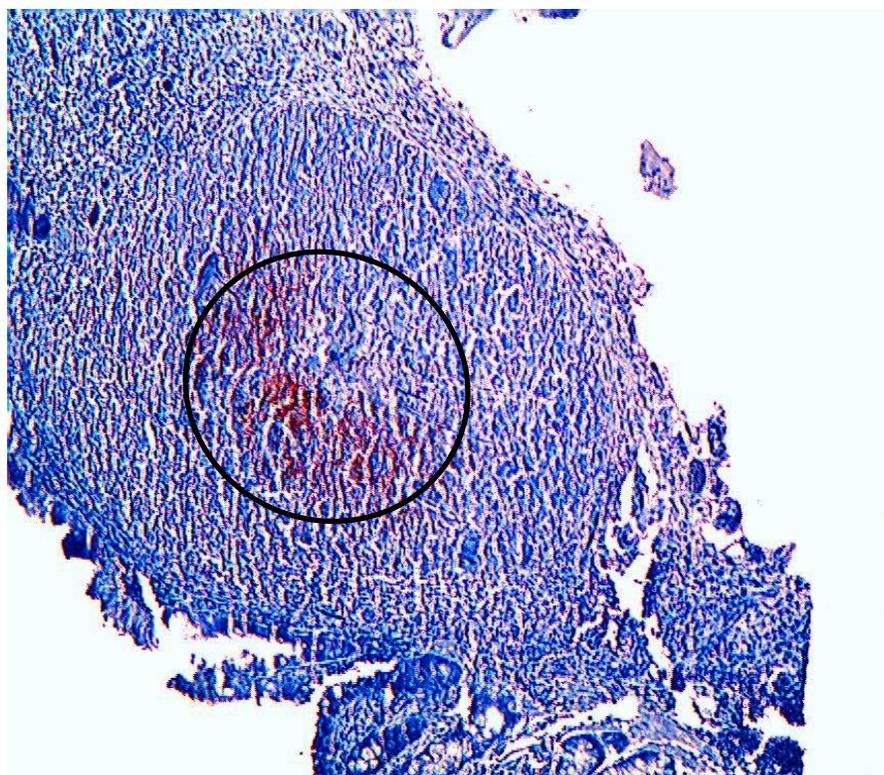
<b>Distancia recto anal (cm)</b>	<b><math>\chi^2</math> observado</b>	<b>P = 0.001</b>	<b>Hipótesis Nula (<math>H_0</math>)</b>
0.5 - 1	0.148	>	Aceptada
0.5 - 1.5	5.847	>	Aceptada
0.5 - 2	16.333	<	Rechazada
0.5 - 2.5	23.336	<	Rechazada
1 - 1.5	7.782	>	Aceptada
1 - 2	19.244	<	Rechazada
1 - 2.5	26.585	<	Rechazada
1.5 - 2	3.130	>	Aceptada
1.5 - 2.5	7.337	>	Aceptada
2 - 2.5	1.091	>	Aceptada

El estudio estadístico nos permite concluir que la mejor distancia para obtener una muestra apta en relación a la presentación de un número de folículos igual o mayor a 4, es entre los 0,5 y 1,5cm de la unión recto anal. Puesto que es donde se encuentra la mayor cantidad de muestras aptas (Gráfico 2) y no existe diferencia significativa en relación a la cantidad de folículos obtenidos entre estas distancias.

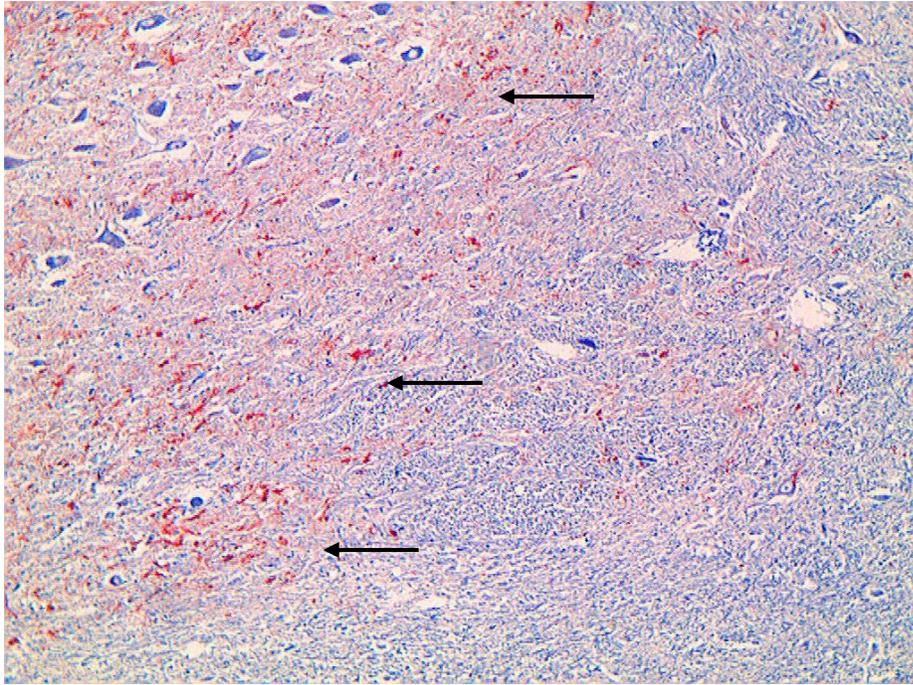
## **Detección de la proteína priónica, a través de la técnica de inmunohistoquímica en la mucosa rectal de ovinos.**

Para analizar las 74 muestras clasificadas como aptas se realizaron los protocolos de IHQ. En cada uno de estos, se utilizó un control positivo de recto y uno de óbex, además de un control negativo de óbex.

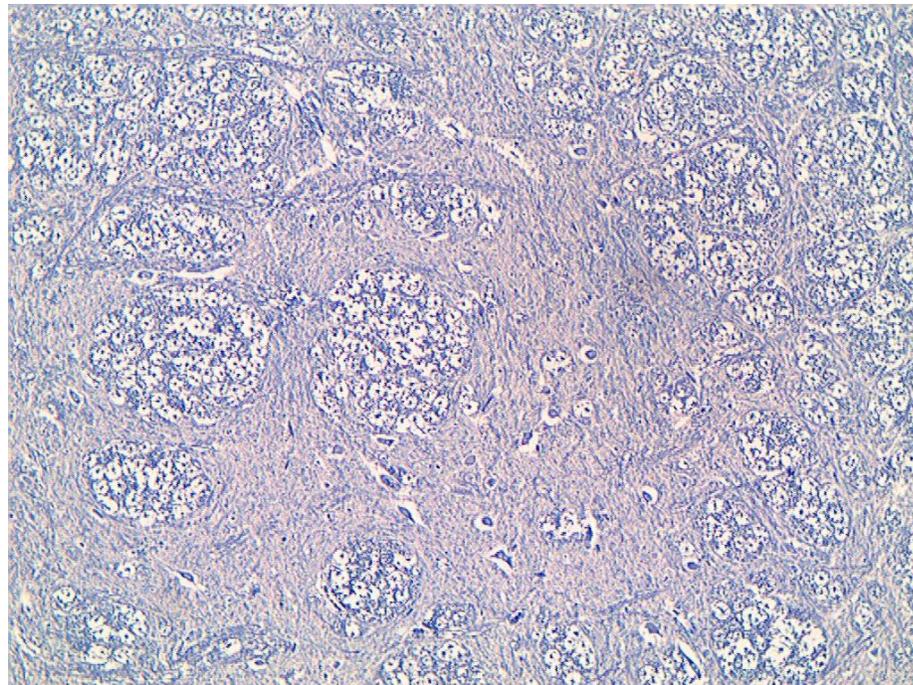
En las siguientes figuras (9, 10 y 11) se presentan los controles positivos y negativos utilizados en este estudio.



**Figura N° 9: microfotografía de un corte histológico de la mucosa del recto ovino. Control positivo, donde se observa el precipitado granular rojo en el centro germinal del folículo linfoide, que se corresponde con inmunotinción de proteína priónica patológica (IHQ, 100X).**



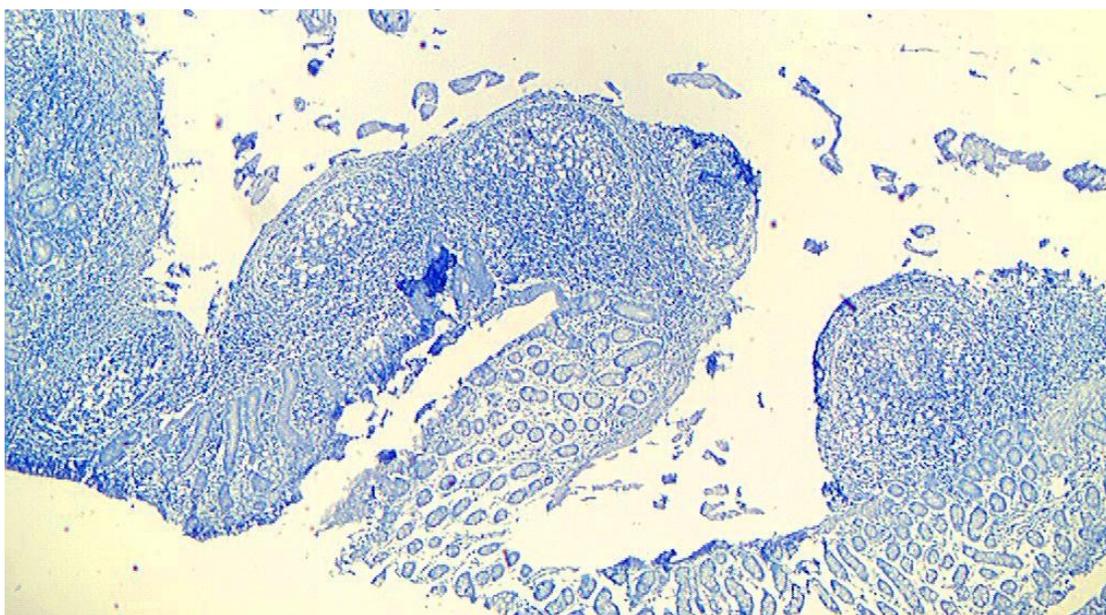
**Figura N° 10: microfotografía de un corte histológico de óbex ovino. Control positivo.** Las flechas indican el la presencia del precipitado granular rojo, correspondiente a la inmunotinción de la proteína priónica patológica (IHQ 100X).



**Figura N° 11: microfotografía de un corte histológico de óbex ovino. Control negativo,** en el cual no se observa el precipitado granular rojo correspondiente a la ausencia de proteína priónica en el tejido. (IHQ 100X).

Los controles positivos, tanto de tejido linfóide de recto (Fig. 8) como de óbex (Fig. 9) de ovino, siempre presentaron inmunotinción observada como precipitado granular rojo. Mientras que en los controles negativos (Fig. 10) nunca se detectó la presencia de esta inmunotinción, posterior a la realización de la IHQ.

En la figura 12 se presenta a manera de ejemplo, una de las muestras aptas para IHQ estudiadas.



**Figura N° 12: microfotografía de un corte histológico de mucosa rectal de ovino. Corte de las muestras realizadas en este estudio.** Se observan más de 4 folículos linfoides y en ninguno de ellos se visualiza precipitado granular rojo, correspondiente a la ausencia de proteína priónica en la muestra, por lo tanto esta es negativa a Scrapie. (IHQ 40X).

En la tabla 6, se presenta el resumen de los datos con los resultados obtenidos al realizar la técnica de IHQ. De acuerdo al análisis de los resultados mostrados en esta tabla, se puede concluir que la totalidad de las muestras seleccionadas por medio de la tinción de H/E como aptas para la técnica de IHQ, resultaron negativas a Scrapie al no presentar el precipitado granular rojo de la inmunotinción, en ninguno de los más de cuatro folículos linfoides examinados, lo cual concuerda con los controles negativos utilizados.

**Tabla N° 6. Resumen del número de muestras aptas analizadas por la técnica IHQ aplicada en el tejido linfoide de la mucosa rectal de ovinos.**

	<b>IHQ</b>	<b>Positivas</b>	<b>Negativas</b>
Muestras aptas diagnóstico	74	0	74
Control (+) recto ovino	6	6	0
Control (+) óbex	6	6	0
Control (-) óbex	6	0	6
Total	92	12	80

Para confirmar la correcta realización de la técnica se utilizaron controles positivos y negativos provenientes de laboratorios de referencia. Es así como los 12 controles positivos utilizados, tanto de óbex como los de recto ovino, siempre presentaron inmunotinción, mientras que, en los 6 controles negativos de óbex nunca se detectó la presencia de algún precipitado producto de la inmunoreacción. Por lo tanto, de acuerdo a los protocolos recomendados y utilizados en esta memoria, 74 muestras fueron diagnosticadas como negativas a la presencia de proteína priónica patógena (PrP<sup>Sc</sup>), las que corresponden a la totalidad de las muestras aptas para IHQ.

## **DISCUSIÓN.**

La crisis surgida en 1996 a raíz del brote de EEB fue, de manera muy significativa, el motor para la investigación en el campo de las enfermedades priónicas, por la cual se han acumulado más investigaciones durante la última década que durante los siglos anteriores. Esto en conjunto, con los considerables avances en los conocimientos sobre la biología del prión, lo cual ha proporcionado además instrumentos y metodologías para su estudio como: técnicas inmunológicas específicas, ratones transgénicos, modelos celulares de infección por EET y la producción de una gran serie anticuerpos monoclonales. Estas pruebas se han utilizado de manera eficiente para el manejo y la gestión de la crisis de las “vacas locas”, que siguen siendo muy útiles tanto para controlar la epizootia de la EEB así como, las diversas formas de EETs presentes en pequeños rumiantes (como el Scrapie en ovejas y cabras), los cérvidos e incluso el hombre (Grassi *et al.*, 2008).

El Scrapie es una encefalopatía espongiforme que afecta principalmente a ovinos y a caprinos. Esta enfermedad es de presentación endémica en varios países Europeos, en algunos de Norteamérica y en aquellos que mantienen explotaciones ovinas. De acuerdo a la información oficial aportada por la OIE, el Scrapie aparece como una enfermedad no señalada en Chile, este estado sanitario ha determinado que aún no se inicien programas intensivos de vigilancia epidemiológica específicos para esta enfermedad. Esto contrasta con la vigilancia que se realiza actualmente para la EEB, enfermedad priónica que, a pesar de que tampoco ha sido descrita en el país, por las exigencias internacionales sí requiere de vigilancia general y dirigida (Madariaga, 2009).

Sin embargo, el Scrapie se ha vuelto una amenaza potencial para la salud humana, ya que existen investigaciones acerca de que el origen del brote de EEB se produjo a partir de una nueva estirpe de Scrapie. Además, la existencia de estudios recientes que plantean la posibilidad de que el agente de la EEB sea transmitido a los ovinos, como se ha demostrado bajo condiciones experimentales, junto con la vinculación directa entre la vECJ de los humanos y la EEB de los bovinos, hacen que esta enfermedad deba ser más investigada (Detwiler y Baylis, 2003).

La habilidad para una determinación temprana y segura, es vital para que la intervención diagnóstica tenga un valor real. Con respecto al animal destinado a consumo humano, hay una demanda adicional hacia determinar la presencia del prión en tejidos de animales asintomáticos, de apariencia saludable y sin sintomatología clínica (Aguzzi *et al.*, 2004).

Es así que los enfoques más prometedores para el diagnóstico preclínicos, parecen ser los basados en la expresión de la proteína priónica alterada previo a la disfunción neurológica de los animales (Parveen *et al.*, 2005). Por lo tanto, la verdadera utilidad diagnóstica de la PrP<sup>Sc</sup> se debe enfocar a la identificación de casos sospechosos, tan temprano como sea posible en su patogénesis (Aguzzi *et al.*, 2004).

La PrP<sup>Sc</sup> se acumula en el SNC y en el SLR en el Scrapie y la vECJ. A pesar de la acumulación de la PrP<sup>Sc</sup> en SLR, no existe asociación con lesiones patológicas en este tejido, en contraste con el SNC, en donde las lesiones son bien conocidas (McGovern y Jeffrey, 2007).

Como resultado, el diagnóstico preclínico de Scrapie en su mayoría ha sido intentado en muestras de biopsia de las amígdalas palatinas, el tercer párpado o los linfonodo linfáticos superficiales. Estos métodos tienen inconvenientes técnicos y no se puede utilizar para grandes poblaciones de ovejas en el campo. Sin embargo, agregados de folículos linfoides están presentes a lo largo del intestino de la oveja, es así como se pueden encontrar en el extremo distal de la mucosa rectal, la que es fácilmente accesible para una biopsia, su estudio inmunológico y posterior diagnóstico (Sedgmen *et al.*, 2002; Gonzalez. *et al.*, 2006).

La eficiencia en relación a la cantidad de individuos con muestras aptas para realizar IHQ que se obtuvo en este ensayo fue de un 61,1%. A diferencia del estudio realizado por Espenes *et al.*, (2006), quien obtuvo de 84 cortes histológicos (42 animales, dos muestras de cada uno) 73 muestras (87%) contenían folículos linfoides. Sin embargo, estos autores no especifican si todas estas muestras eran aptas (presenten al menos 4 folículos linfoides) para realizar la técnica de IHQ.

Los agregados linfoides presentes en la mucosa rectal no son perceptibles a simple vista, por lo que es posible que las muestras de la biopsia puedan no ser adecuadas para los fines diagnósticos. Es por esto que en esta memoria, se planteó dentro de los objetivos el estandarizar la ubicación anatómica para la mejor obtención de tejido linforreticular, con el propósito de obtener la cantidad de centros germinales adecuados ( $\geq 4$ ) para considerar una muestra de mucosa rectal como apta y así, realizar la técnica diagnóstica de IHQ. Para cumplir con este objetivo, se aplicó la prueba de *chi cuadrado* ( $\chi^2$ ) que permitió comparar las distintas distancias de toma de muestras, es así que se observó diferencias estadísticamente significativas en la obtención de la cantidad mínima de folículos para muestras aptas, entre las distancias de 0,5 y 2cm.; 0,5 y 2,5cm.; 1 y 2cm.; 1 y 2,5cm. indicando así, como las zonas recomendadas, es decir, la mejor distancia para obtener las muestras aptas para IHQ, las distancias de 0,5 y 1cm desde la línea recto anal, puesto que es donde se encuentra la mayor cantidad folículos linfoides (Gráfico 2). Sin embargo, al no existir diferencia entre las distancias de 1 y 1,5cm, se debe asignar como la zona más adecuada para obtener las muestras aptas a aquella comprendida entre las distancias de  $\geq 0,5$  y  $< 1,5$ cm desde la línea recto anal o unión mucocutánea. Estos resultados fueron consistentes con los descritos por Gonzalez *et al.*, (2008).

Cabe destacar que, a pesar de que no hay asociación entre la obtención del número mínimo de folículos necesarios para que la muestra sea clasificada como apta para IHQ, entre las distancias de 1,5 y 2cm; 1,5 y 2,5cm; 2 y 2,5cm, esta zona no se considera como ideal para la obtención de muestras para el diagnóstico por IHQ a partir de una biopsia rectal, puesto que es donde se encuentra una mayor proporción de individuos no aptos, es decir, con un número de folículos linfoides inferior a 4 (Gráfico 3).

En relación a la influencia de la edad sobre el número de folículos linfoides en muestras de mucosa rectal, está establecido en la literatura afin, que el tejido linfoides asociado a intestino presenta una regresión con la edad, por lo que se esperaría encontrar un menor número de folículos linfoides en la mucosa rectal de ovejas con mayor edad, lo cual podría comprometer la eficacia de las biopsias como muestras de diagnóstico para Scrapie (Gonzalez *et al.*, 2008). Junto con esto se sugiere que la variable peso también podría

influir en la distribución de estos folículos. Sin embargo, estas variables no fueron posible de medir para este estudio, puesto que las muestras fueron obtenida desde los mataderos de Punta Arenas (XII, Duodécima región de Magallanes y la Antártica Chilena), por lo que no fue posible identificar precisamente la edad del animal, si no que sólo se aceptaron aquellas de animales mayores a 2 años de edad, así como tampoco fue posible conocer el peso de los animales en forma individual. No obstante el considerar sólo a los mayores de 2 años, edad en la cual es posible detectar clínicamente la enfermedad, la que se desarrolla preferentemente entre 2 a 5 años de edad y tiene un período de incubación de al menos 1 año, permitió incluir en el estudio el rango de ovejas de mayor riesgo (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Por otra parte, la temprana distribución de PrP<sup>Sc</sup> en el tejido linfoide no es homogénea; por consiguiente, se debe considerar que cuando aplicamos un análisis con IHQ, se requiere un número mínimo de 4 centros germinales a ser examinados para proveer un diagnóstico fidedigno (Gavier-Widén *et al.*, 2005). Junto con esto, cabe señalar que la intensidad de inmunotinción varía de forma individual entre las ovejas, pero no se correlaciona con la edad o estatus clínico de éstas. Además, la distribución en los tejidos, especificidad o intensidad de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> no difiere entre los genotipos (Caplazi *et al.*, 2004).

El hecho de que una muestra de biopsia no contenga folículos linfoides o estos sean muy pocos, no significa que el resultado sea un falso negativo, esto dependerá de la prevalencia del Scrapie en el rebaño de ovejas, la cual puede estimarse a partir de la proporción de casos positivos por biopsia. Como con cualquier otra prueba de diagnóstico, un resultado negativo individual nunca puede ser considerado prueba de ausencia de la condición de que se trate; los resultados tienen que ser evaluados a la luz de las pruebas repetidas a nivel individual y de rebaño (Gonzalez *et al.*, 2008).

Además de la sensibilidad de la IHQ, la biopsia rectal tiene claras ventajas prácticas respecto a la obtención de la amígdala palatina o del tercer párpado. El procedimiento es sencillo, rápido y no tiene efectos adversos; puede haber sangrado ocasional, pero es mínimo y después del procedimiento, los animales siguen comiendo y se comportan

normalmente. Las biopsias pueden ser tomadas en repetidas ocasiones de la misma oveja sin detrimento de su bienestar o el número de folículos de destino. Además, no son necesarias la anestesia ni la sedación y las herramientas de la biopsia son desechables y de bajo costo. En menos de condiciones ideales, un equipo de tres personas puede realizar entre 30 a 35 biopsias en una hora, el número probablemente se podría aumentar mediante la organización del manejo de las ovejas. La utilidad del procedimiento no se limita a las EET de ovejas, sino que también puede aplicarse a las cabras y cérvidos (Espenes *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008).

La mayoría de los estudios revisados en esta memoria, realizan sus pruebas comparando el genotipo de los ovinos, puesto que hay una clara base genética que determina resistencia o baja prevalencia de la enfermedad clínica. Los ensayos realizados por Gonzalez *et al.*, (2006), muestran que la PrP<sup>Sc</sup> puede ser detectada constantemente por IHQ en el SLR durante la etapa preclínica y clínica del Scrapie, esto independientemente del genotipo de la PrP del hospedero. A pesar de no haber información en Chile, acerca de la presencia o no de Scrapie, se dice que está libre de la enfermedad, sin embargo sería más adecuado al menos iniciar un estudio de los genotipos presentes en nuestro territorio, para comenzar a tener una idea de la susceptibilidad de la masa ovina presente en el país.

De acuerdo a los objetivos planteados para la realización de esta memoria de título, los resultados obtenidos y la discusión originada de éstos, es que se plantean las siguientes conclusiones.

## CONCLUSIÓN.

Por medio de la tinción de Hematoxilina y Eosina (H/E), fue posible evaluar la cantidad de centros germinales presentes en los cortes histológicos. Lo que permite clasificar a aquellas que son aptas para realizar el protocolo de IHQ.

La mejor área para tomar muestras de la mucosa rectal y obtener el tejido linforreticular necesario para el diagnóstico por medio de IHQ, corresponde a la zona más caudal del ano, específicamente aquella mayor o igual que 0,5cm y menor a 1,5cm craneales a la unión mucocutánea.

Todas las muestras de mucosa rectal provenientes de los animales del matadero de Punta Arenas que fueron analizadas por la técnica de IHQ resultaron negativas a Scrapie, puesto que en ninguna se observó el precipitado granular rojo, indicativo de positividad para esta enfermedad. En cambio, sí se observó en todos los controles positivos, tanto de recto como de óbex ovino.

La biopsia rectal es una herramienta potencialmente práctica para el diagnóstico preclínico del Scrapie, debido a que el tejido linfoide rectal es fácilmente accesible en ovinos vivos, lo que facilita una rápida toma de muestras.

Es posible incluir los protocolos de IHQ utilizando muestras de biopsia rectal en los programas de vigilancia o de las estrategias de control como una prueba para el *screening*, es decir, una prueba de alta sensibilidad diagnóstica, para ser utilizada *in vivo*.

Se logró validar la técnica de IHQ para la detección de proteína priónica en muestras de tejido rectal de ovinos *post mortem* en las condiciones de laboratorio país.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- 1. Aguzzi, A. 2006.** Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J. Neurochem.* 97: 1726 – 1739.
- 2. Aguzzi, A.; Heikenwalder, M.; Miele, G. 2004.** Progress and problems in the biology, diagnostic, and therapeutics of prion diseases. *J. Clin. Invest.* 114: 153 – 160.
- 3. Aguzzi A.; Sigurdson, C.; Heikenwaelder, M. 2008.** Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3: 11 – 40.
- 4. Beekes, M.; McBride, P. 2007.** The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS* 274: 588 – 605.
- 5. Bermejo, F.; Muñoz, D. 2001.** Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSEs) o enfermedades producidas por priones. *Rev. Adm. San.* 17: 27 – 44.
- 6. Bozzeta, E.; Acutis, P.; Martucci, F.; Nappi, R.; Casalone, C.; Mazza, M.; Caramelli, M. 2004.** Evaluation of rapid test for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats. *Acta Neuropathol.* 107: 559 – 562.
- 7. Bravo, C. 2008.** Diagnóstico de Scrapie por inmunohistoquímica en tejido linfoide del tercer parpado en ovinos. Memoria de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias. 99p
- 8. Caplazi, P.; O'Rourke, K.; Wolf, C.; Shaw, D.; Baszler, T. 2004.** Biology of PrP<sup>Sc</sup> accumulation in two natural scrapie- infected sheep flocks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 489 – 496.
- 9. Crozet, C.; Beranger, F.; Lehmann, S. 2008.** Cellular pathogenesis in prion diseases. *Vet. Res.* 39 (44): 1- 17.

- 10. Davies, M.; Hopkins, L.; Halliday, S.; Houston, F.; Hunter, N.; M<sup>c</sup> Connell, I. 2004.** Architecture of secondary lymphoid tissue in sheep experimentally challenged with Scrapie. *Immunology* 111: 230 – 236.
- 11. Debeer, S.; Baron, T.; Bencsik, A. 2002.** Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrP<sup>Sc</sup> immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 611 – 616.
- 12. De Girolami, U.; Anthony, D.; Frosch, M. 2000.** El sistema nervioso central. **In:** Robbins, *Patología Estructural y Funcional*. 6<sup>a</sup> edición. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, España. pp. 1339-1406.
- 13. DEFRA (Department for Environment Food and Rural Affairs). 2005.** Sheep and goat TSEs. Section 6. **In:** *Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) in great Britain 2005 – A Progress Report*. Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA). pp: 1 – 82.
- 14. Detwiler, L.; Baylis, M. 2003.** The epidemiology of Scrapie. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 22 (1): 121 – 143.
- 15. Doherr, M. 2007.** Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). *Vaccine* 25: 5619 – 5624.
- 16. Dormont, D. 2002.** Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett.* 529: 17 – 21.
- 17. Espenes, A.; Press, C.; Landsverk, T.; Tranulis, M. A.; Aleksandersen, M.; Gunnes, G.; Benestad, S. L.; Fuglestad, R.; Ulvund, M. J. 2006.** Detection of PrP<sup>Sc</sup> in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental Scrapie. *J. Comp. Path.* 134: 115 – 125.

- 18. Fournier, J.; Grigoriev, V. 2001.** Prion diseases: contribution of high-resolution immunomorphology. *J. Cell. Mol. Med.* 5 (4): 367 – 377.
- 19. Gavier-Widén, D.; Stack, M. J.; Baron, T.; Balachandran, A.; Simmons, M. 2005.** Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 509 – 527.
- 20. González, L. 2002.** Consideraciones acerca del diagnóstico y control del Scrapie. **In:** Ponencia en XXVII Jornadas Científicas de la S.E.O.C. Valencia., España. pp: 79 – 91.
- 21. González, L.; Daleish, M. P.; Bellworthy, S. J.; Sisó, S.; Stack, M. J.; Chaplin, M. J.; Davis, L. A.; Hawkins, S. A. C.; Hughes, J.; Jeffrey, M. 2006.** Postmortem diagnosis of preclinical and clinical Scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet. Rec.* 158: 325 – 331.
- 22. González, L.; Daleish, M. P.; Martin S.; Dexter, G.; Steele, P.; Finlayson, J.; Jeffrey, M. 2008.** Diagnosis of preclinical Scrapie in live Sheep by immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet. Rec.* 162: 397 – 403.
- 23. Grassi, J.; Maillet, S.; Simon, S.; Morel, N. 2008.** Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet. Res.* 39 (33): 1 – 12.
- 24. Hamir, A.; Miller, J.; Schmerr, M.; Stack, M.; Chaplin, J.; Cutlip, R. 2001.** Brief communications: Diagnosis of preclinical and subclinical Scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing currently available post-mortem diagnostic techniques. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 152 – 154.
- 25. Jeffrey, M.; González, L. 2007.** Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: patogénesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33: 373 – 394.

- 26. Katz, J.; Shafer, A.; Miller, J. 1995.** Production of antiserum for the diagnosis of Scrapie and bovine spongiform encephalopathy using a baculovirus-expressed prion protein antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 245 – 247.
- 27. Lysek, D. A.; Schorn, C.; Nivon, L. G.; Esteve-Moya, V.; Christen, B.; Calzolari, L.; von Schroetter, C.; Fiorito, F.; Herrmann, T.; Güntert, P.; Wüthrich, K. 2004.** Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs and sheep. *PNAS.* 102 (3): 640 – 645.
- 28. Mabbott, N.; Brown, K.; Manson, J.; Bruce, M. 1997.** T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* 92: 161 – 165.
- 29. Mabbot, N.; Bruce, M. 2001.** The immunobiology of the TSE diseases. *J. Gen. Virol.* 82: 2307 – 2318.
- 30. Madariaga, M. C. 2009.** Utilización de inmunorreacciones para la detección de Scrapie en óbex de ovinos provenientes de la XII Región de Chile. Memoria de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y pecuarias. 78 p.
- 31. McGovern, G.; Jeffrey, M. 2007.** Scrapie – Specific pathology of sheep lymphoid tissues. *PLoS ONE* 2 (12): (1304 – 1314).
- 32. Miller, J.; Jenny, A.; Taylor, W.; Marsh, F.; Rubenstein, R.; Race, R. 1993.** Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 309 – 316.
- 33. Noinville, S.; Chich, J-F.; Rezaei, H. 2008.** Misfolding of the prion protein: linking biophysical and biological approaches. *Vet. Res.* 39 (48): 1 – 17.
- 34. OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). 2004.** Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Volumes I and II, 5<sup>th</sup> Edition. pp: 1 – 28.

- 35. OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). 2007a.** Scrapie. The Center for Food Security & Public Health (CFSPH). Junio. pp. 1 - 6.
- 36. OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). 2007b.** Informe anual de salud animal para la notificación de la ausencia o presencia de todas las enfermedades. OIE: 30526, 26701, 23541, periodo del informe ene. - dic. 2007 país: Chile. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagVerRegistro.asp?argInstanciaId=49&argRegistroId=2772>> [consulta: 16-04-09]. pp: 1 – 15.
- 37. OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). 2010.** Estatus de los miembros respecto de la encefalopatía espongiforme bovina. Estatus sanitario oficial. [en línea] <[http://www.oie.int/esp/Status/BSE/es\\_BSE\\_free.htm#1](http://www.oie.int/esp/Status/BSE/es_BSE_free.htm#1)> [Consulta: 17-02-10].
- 38. Parveen, I.; Moorby, J.; Allison, G.; Jackman, R. 2005.** The use of non- prion biomarkers for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in the live animal. *Vet. Res.* 36: 665 – 683.
- 39. Prusiner, S. 1995.** The prion diseases. *Sci. Am.* 272 (1): 48-56.
- 40. Prusiner, S. 1998.** Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13363 – 13383.
- 41. Ronga, L.; Tizzano, B.; Palladito, P.; Ragone, R.; Urso, E.; Mafia, M.; Ruvo, M.; Benedetti, E. y Rossi, F. 2006.** The prion protein: structural features and related toxic peptides. *Chem. Biol. Drug Des.* 68: 139 – 147.
- 42. Ryou, C. 2007.** Prions and prion diseases: fundamentals and mechanistic details. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (7): 1059 – 1070.
- 43. SAG (Servicio Agrícola Ganadero). 2003.** Manual de contingencia de encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales (EETs). Chile. pp. 47.

- 44. SAG (Servicio Agrícola Ganadero). 2006.** Situación sanitaria animal. División protección pecuaria. Chile. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagVerRegistro.asp?argInstanciaId=49&argRegistroId=2767>> [consulta: 29-04-09]. pp: 1 – 75.
- 45. SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). 2010.** Programa de vigilancia de enfermedades de animales. División de protección pecuaria subdepartamento de vigilancia epidemiológica. Servicio Agrícola y Ganadero. Chile. pp: 1 – 48.
- 46. Sedgmen, B.; Lofthouse, S.; Scheerlinck, J-P.; Meeusen, E. 2002.** Cellular and molecular characterisation of the ovine rectal mucosal environment. Vet. Immunol. immunopathol. 86: 215 – 220.
- 47. Taucher, E. 1997.** Capitulo 17: Prueba Ji – Cuadrado ( $\chi^2$ ) **In:** Bioestadística; Primera Edición; Editorial Universitaria; Santiago de Chile. (17):145-150.
- 48. Torres, JM; Brun, A.; Castilla, J. y Sánchez-Vizcaíno, JM. 2001.** Enfermedades producidas por priones. [en línea] <<http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/bse/priones/priones.htm> > [consulta: 08-11-08].
- 49. Tyler, J. W.; Weaver, D. M.; Turk, J. R.; O'Rourke, K. I.; Harrington, M. G.; Taylor, W.; Jenny, A. 1999.** Naturally occurring Scrapie in southdown sheep. J. Vet. Intern. Med. 13: 213 – 216.
- 50. van Keulen, L. J. M.; Vromans, M. E. W.; van Zijderveld, F. 2002.** Early and late pathogenesis of natural Scrapie infection in sheep. APMIS 110: 23 – 32.
- 51. van Keulen, L. J. M.; Bossers, A.; van Zijderveld, F. 2008a.** TSE patogénesis in cattle and sheep. Vet. Res. 39: 1- 12.

- 52. van Keulen, L. J. M.; Vromans, M.; Dolstra, C.; Bossers, A.; van Zijderveld, F. 2008b.** Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch. Virol.* 153: 445-453.
- 53. Zomosa-Signoret, V.; Arnaud, J.; Fontes, P. ; Alvarez-Martinez, M.; Liautard, J. 2008.** Physiological role of the cellular prion protein. *Vet. Res.* 39: 1-16.

## ANEXOS.

### Anexo 1. Programa de procesamiento aplicado a las muestras de mucosa rectal de ovinos.

ESTACIÓN	REACTIVO	TEMPERATURA	DURACIÓN (min)
1	Alcohol 70°	A	120
2	Alcohol 90°	A	90
3	Alcohol 95° I	A	60
4	Alcohol 95° II	A	60
5	Alcohol 100° I	A	60
6	Alcohol 100° II	A	60
7	Alcohol 100° III	A	60
8	Xilol I	A	60
9	Xilol II	A	60
10	Xilol III	A	90
11	Parafina I	57° C	120
12	Parafina II	57° C	120

A= Temperatura ambiente.

### Anexo 2. Procedimiento aplicado para la rehidratación de las muestras de la mucosa rectal de ovino para la tinción H/E.

SOLVENTE	TIEMPO INCUBACIÓN (min.)
Xilol I	3
Xilol II	3
Xilol III	5
Alcohol 100% I	3
Alcohol 100% II	3
Alcohol 95% I	3
Alcohol 95% II	3
Alcohol 70%	3
Agua Corriente	2- 3

### Anexo 3. Protocolo para la tinción H/E.

<b>Baño</b>	<b>TIEMPO INCUBACIÓN (min.)</b>
Hematoxilina	5
agua corriente	5
Alcohol ácido	Pasada rápida
Agua corriente	10
Carbonato de litio	Hasta que núcleos se observen azules
Agua corriente	5
Eosina	5
Alcohol 95°	Pasada rápida
Alcohol 100°	1
Alcohol 100°	2
Xilo I	2
Xilo II	2
Xilo III	3

### Anexo 4. Procedimiento aplicado para la rehidratación de las muestras de la mucosa rectal de ovinos para la técnica de IHQ.

<b>SOLVENTE</b>	<b>TIEMPO INCUBACIÓN (min.)</b>
Xilol	5
Xilol	5
Alcohol 100%	4
Alcohol 100%	4
Alcohol 95%	3
Alcohol 80%	3

**Anexo 5. Registro de las muestras aptas y no aptas para IHQ por ovino, a distintas  
distinta distancia desde la línea recto anal**

Muestra N°	Distancia recto anal				
	0, 5cm.	1cm.	1, 5cm.	2cm.	2, 5cm.
14	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta
15	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
16	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta
17	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta
19	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
20	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
22	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta
23	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta
24	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
25	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
26	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta
27	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
28	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta
29	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta
30	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta
31	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
32	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
33	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
34	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
35	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
36	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta
37	No apta	Apta	Apta	No apta	No apta
38	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta
39	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
40	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
41	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
43	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta
44	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
45	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
47	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta
48	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
50	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
51	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
54	No apta	No apta	Apta	Apta	Apta
58	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
59	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
61	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
62	No apta	No apta	No apta	No apta	Apta
63	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta
64	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta
65	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta

66	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
67	No apta	Apta	No apta	No apta	Apta
68	No apta				
69	No apta				
70	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
71	No apta				
72	No apta				
73	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta
74	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta
75	No apta				
76	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta
77	No apta				
79	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta

**Anexo 6. Cálculo de ji – Cuadrado ( $\chi^2$ ) observado para el universo total de las muestras.**

**Conjunto de datos:** distribución de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a distinta distancia desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0,5	25	46,30	29	53,70	54	100
1	27	50,00	27	50,00	54	100
1,5	13	24,07	41	75,93	54	100
2	6	11,11	48	88,89	54	100
2,5	3	5,56	51	94,44	54	100

**Planteamiento de hipótesis:**

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe asociación entre la distancia recto anal y la presentación del Nº mínimo de folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe asociación entre la distancia recto anal y la presentación de Nº mínimo de folículos aptos para IHQ, es decir, el porcentaje de Nº de folículos aptos para IHQ es diferente por lo menos en dos ubicaciones.

### Cálculo del Ji – cuadrado

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
0,5	Apta	25	14,800	10,200	7,030
	No Apta	29	39,200	-10,200	2,654
1	Apta	27	14,800	12,200	10,057
	No Apta	27	39,200	-12,200	3,797
1,5	Apta	13	14,800	-1,800	0,219
	No Apta	41	39,200	1,800	0,083
2	Apta	6	14,800	-8,800	5,232
	No Apta	48	39,200	8,800	1,976
2,5	Apta	3	14,800	-11,800	9,408
	No Apta	51	39,200	11,800	3,552
Total		270	270	0	44,007

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para cuatro grados de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,05$ . Se obtiene un  $\chi^2$  crítico = 9, 49.

**Conclusión:** con los resultados se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto el porcentaje de n° mínimo de folículos aptos para IHQ es diferente por lo menos en dos ubicaciones.

### Anexo 7. Cálculo de ji - Cuadrado ( $\chi^2$ ) observado entre grupos de muestras.

**A. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 0, 5 y 1cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0,5	25	46,30	29	53,70	54	100
1	27	50,00	27	50,00	54	100
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>48,15</b>	<b>56</b>	<b>51,85</b>	<b>108</b>	<b>100</b>

#### Planteamiento de hipótesis:

**Hipótesis nula:** ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancia 0, 5 y 1cm desde la línea recto anal y la obtención del n° mínimo de folículos aptos para IHQ.

**Hipótesis alternativa:** ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 0, 5 y 1cm desde a línea recto anal.

### Cálculo del Ji – cuadrado

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
0,5	Apta	25	26,000	-1,000	0,038
	No Apta	29	28,000	1,000	0,036
1	Apta	27	26,000	1,000	0,038
	No Apta	27	28,000	-1,000	0,036
<b>Total</b>		108	108	0	0,148

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8

**Conclusión:** con los resultados se acepta la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 0, 5 y 1cm desde la línea recto anal.

**B. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 0, 5 y 1, 5cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0,5	25	46,30	29	53,70	54	100
1,5	13	24,07	41	75,93	54	100
<b>Total</b>	38	35,19	70	64,81	108	100

### Planteamiento de hipótesis:

*Hipótesis nula:* (H<sub>0</sub>): No existe diferencia entre las distancia 0,5 y 1, 5cm desde la línea recto anal y la obtención del número mínimo de folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* (H<sub>1</sub>): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 0, 5 y 1, 5cm desde a línea recto anal.

### Cálculo del Ji – cuadrado

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
0,5	Apta	25	19,000	6,000	1,895
	No Apta	29	35,000	-6,000	1,029
1,5	Apta	13	19,000	-6,000	1,895
	No Apta	41	35,000	6,000	1,029
<b>Total</b>		108	108	0	5,847

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8

**Conclusión:** con los resultados se acepta la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 0, 5 y 1, 5cm desde la línea recto anal.

**C. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 0, 5 y 2cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0,5	25	46,30	29	53,70	54	100
2	6	11,11	48	88,89	54	100
<b>Total</b>	31	28,70	77	71,30	108	100

**Planteamiento de hipótesis:**

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancia 0,5 y 2cm desde la línea recto anal y la obtención del número mínimo de folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 0, 5 y 2cm desde a línea recto anal.

**Cálculo del Ji – cuadrado**

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
0,5	Apta	25	15,500	9,500	5,823
	No Apta	29	38,500	-9,500	2,344
2	Apta	6	15,500	-9,500	5,823
	No Apta	48	38,500	9,500	2,344
<b>Total</b>		108	108	0	16,333

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto si hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 0, 5 y 2cm desde la línea recto anal.

**D. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 0, 5 y 2, 5cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0,5	25	46,30	29	53,70	54	100
2,5	3	5,56	51	94,44	54	100
<b>Total</b>	28	25,93	80	74,07	108	100

**Planteamiento de hipótesis:**

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancia 0, 5 y 2, 5cm desde la línea recto anal y la obtención del número mínimo de folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 0, 5 y 2, 5cm desde a línea recto anal.

**Cálculo del Ji – cuadrado**

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
0,5	Apta	25	14,000	11,000	8,643
	No Apta	29	40,000	-11,000	3,025
2,5	Apta	3	14,000	-11,000	8,643
	No Apta	51	40,000	11,000	3,025
<b>Total</b>		108	108	0	23,336

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto si hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 0, 5 y 2, 5cm desde la línea recto anal.

**E. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 1 y 1, 5cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	27	50,00	27	50,00	54	100
1,5	13	24,07	41	75,93	54	100
<b>Total</b>	40	37,04	68	62,96	108	100

### Planteamiento de hipótesis:

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancias 1 y 1,5 cm desde la línea recto anal y la obtención del número mínimo de folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 1 y 1,5 cm desde la línea recto anal.

### Cálculo del Ji – cuadrado

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
1	Apta	27	20,000	7,000	2,450
	No Apta	27	34,000	-7,000	1,441
1,5	Apta	13	20,000	-7,000	2,450
	No Apta	41	34,000	7,000	1,441
<b>Total</b>		108	108	0	7,782

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se acepta la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 1 y 1,5 cm desde la línea recto anal.

**F. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 1 y 2 cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	27	50,00	27	50,00	54	100
2	6	11,11	48	88,89	54	100
<b>Total</b>	33	30,56	75	69,44	108	100

### Planteamiento de hipótesis:

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancias 1 y 2 cm desde la línea recto anal y la obtención de número mínimo folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número de folículos aptos para IHQ a las distancias de 1 y 2 cm desde la línea recto anal.

### Cálculo del Ji – cuadrado

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
1	Apta	27	16,500	10,500	6,682
	No Apta	27	37,500	-10,500	2,940
2	Apta	6	16,500	-10,500	6,682
	No Apta	48	37,500	10,500	2,940
<b>Total</b>		108	108	0	19,244

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto si hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 1 y 2cm desde la línea recto anal.

**G. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 1 y 2, 5cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	27	50,00	27	50,00	54	100
2,5	3	5,56	51	94,44	54	100
<b>Total</b>	30	27,78	78	72,22	108	100

### Planteamiento de hipótesis:

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancia 1 y 2, 5cm desde la línea recto anal y la obtención del número mínimo folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 1 y 2, 5cm desde a línea recto anal.

### Cálculo del Ji – cuadrado

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
1	Apta	27	15,000	12,000	9,600
	No Apta	27	39,000	-12,000	3,692
2,5	Apta	3	15,000	-12,000	9,600
	No Apta	51	39,000	12,000	3,692
<b>Total</b>		108	108	0	26,585

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  critico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto si hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 1 y 2, 5cm desde la línea recto anal.

**H. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 1, 5 y 2cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1,5	13	24,07	41	75,93	54	100
2	6	11,11	48	88,89	54	100
<b>Total</b>	19	17,59	89	82,41	108	100

**Planteamiento de hipótesis:**

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancia 1, 5 y 2cm desde la línea recto anal y la obtención de folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número de folículos aptos para IHQ a las distancias de 1, 5 y 2cm desde a línea recto anal.

**Cálculo del Ji – cuadrado**

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
1,5	Apta	13	9,500	3,500	1,289
	No Apta	41	44,500	-3,500	0,275
2	Apta	6	9,500	-3,500	1,289
	No Apta	48	44,500	3,500	0,275
<b>Total</b>		108	108	0	3,130

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  critico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se acepta la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 1, 5 y 2cm desde la línea recto anal.

**I. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 1, 5 y 2, 5cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1,5	13	24,07	41	75,93	54	100
2,5	3	5,56	51	94,44	54	100
<b>Total</b>	16	14,81	92	85,19	108	100

**Planteamiento de hipótesis:**

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancia 1,5 y 2, 5cm desde la línea recto anal y la obtención del número mínimo de folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 1, 5 y 2, 5cm desde a línea recto anal.

**Cálculo del Ji – cuadrado**

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
1,5	Apta	13	8,000	5,000	3,125
	No Apta	41	46,000	-5,000	0,543
2,5	Apta	3	8,000	-5,000	3,125
	No Apta	51	46,000	5,000	0,543
<b>Total</b>		108	108	0	7,337

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se acepta la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 1, 5 y 2cm desde la línea recto anal.

**J. Conjunto de datos:** grupo de muestras teñidas con H/E aptas y no aptas para IHQ, a las distancias 2 y 2, 5cm desde la línea recto anal

Distancia Recto anal	Aptas		No Aptas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
2	6	11,11	48	88,89	54	100
2,5	3	5,56	51	94,44	54	100
<b>Total</b>	9	8,33	99	91,67	108	100

**Planteamiento de hipótesis:**

*Hipótesis nula:* ( $H_0$ ): No existe diferencia entre las distancia 2 y 2, 5cm desde la línea recto anal y la obtención del número mínimo folículos aptos para IHQ.

*Hipótesis alternativa:* ( $H_1$ ): Si existe diferencia en el número mínimo de folículos aptos para IHQ a las distancias de 2 y 2, 5cm desde a línea recto anal.

**Cálculo del Ji – cuadrado**

Distancia Recto anal		Frecuencias		(O - E)	(O - E) <sup>2</sup> /E
		Observadas	Esperadas		
2	Apta	6	4,500	1,500	0,500
	No Apta	48	49,500	-1,500	0,045
2,5	Apta	3	4,500	-1,500	0,500
	No Apta	51	49,500	1,500	0,045
<b>Total</b>		108	108	0	1,091

$\chi^2$  observado

**Ji – cuadrado crítico:** para un grado de libertad con un nivel de significancia igual a  $\alpha=0,0011$   $\chi^2$  crítico = 10,8.

**Conclusión:** con los resultados se acepta la Hipótesis nula, por lo tanto no hay diferencia entre los cortes aptos para IHQ a 2 y 2, 5cm desde la línea recto anal.