



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DIAGNÓSTICO IN VIVO DE SCRAPIE MEDIANTE
INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO LINFOIDE
DEL TERCER PARPADO EN OVINOS**

ELIZABETH NATALIE IBAÑEZ LAGOS

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

PROFESOR GUÍA: FARÍAS ROLDÁN, GUSTAVO

**SANTIAGO, CHILE
2012**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE CIENCIAS VETERINARIAS

DIAGNÓSTICO IN VIVO DE SCRAPIE MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO LINFOIDE DEL TERCER PARPADO EN OVINOS

ELIZABETH NATALIE IBAÑEZ LAGOS

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

PROFESOR GUÍA: FARÍAS ROLDÁN, GUSTAVO

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. GUSTAVO FARIAS R.
PROFESOR CONSEJERO: DR. CLAUDIO LECOCQ P.
PROFESOR CONSEJERO: DR. PEDRO ABALOS P.

**SANTIAGO, CHILE
2012**

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	7
GENERALIDADES DE ENFERMEDADES PRIÓNICAS.....	7
ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN HUMANOS.....	11
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD).....	12
Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD).....	12
ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORME EN ANIMALES.....	13
Encefalopatía espongiforme bovina (EEB).....	14
Scrapie.....	14
Cepa Nor 98.....	27
Contaminación ambiental y transmisión de la infección.....	31
Situación nacional.....	35
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	37
MATERIAL Y METODO.....	38
Obtención de muestras de tercer párpado ovino.....	38
Procesamiento e inclusión en parafina.....	39
Preparación de los cortes.....	39
Hematoxilina-Eosina.....	39
Inmunohistoquímica.....	40
Análisis de las muestras.....	42
RESULTADOS.....	43
DISCUSION.....	49
CONCLUSION.....	55
REFERENCIAS.....	56
ANEXOS.....	63

RESUMEN.

El Scrapie es una enfermedad neurodegenerativa producida por priones que afecta a ovinos y caprinos, descrita desde el siglo XVIII. El prion es una proteína de conformación anormal que se propaga transformando la isoforma normal del hospedero. La lesión patológica más característica es la vacuolización, ya sea en el soma neuronal o del neuropilo.

La identificación de los casos sospechosos es el primer paso en el programa de vigilancia para esta enfermedad. La técnica de inmunohistoquímica, se utiliza para evidenciar el depósito de la proteína patológica en el tejido nervioso como el óbex, lo cual limita el diagnóstico a ser realizado solo después de la muerte del animal. Por esto, es necesaria una herramienta que entregue información de los animales en los estados preclínicos, así la biopsia de tejido linfoide de tercer párpado, ha sido descrita para realizar estudios *in vivo* de Scrapie en ovejas y cabras.

Con estos antecedentes, se realizó este estudio en animales vivos en nuestro país, de la Región Metropolitana, con el fin de estandarizar la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y desarrollar un protocolo *in vivo*, adecuado a nivel del laboratorio país. Chile ha sido declarado libre de Scrapie, para esto el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), cuenta con herramientas diagnósticas como la IHQ, la histopatología, el *Western Blot* y el *ELISA*, que son realizados *post mortem*.

En este estudio se muestrearon 75 ovejas mayores de dos años de edad, de las cuales se extrajo el tejido linfoide del tercer párpado. Las muestras fueron sometidas a tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) para clasificar su aptitud de acuerdo a la cantidad de centros germinales. De la totalidad de las muestras, 50 fueron clasificadas como aptas para continuar con la técnica de IHQ, lo que corresponde a un 66,6% de los individuos muestreados, esto porque la cantidad de centros germinales del tejido linfoide necesarios para diagnosticar una muestra como negativa debe ser igual o mayor a 4

Todas las muestras evaluadas por IHQ fueron negativas a Scrapie, al no presentar en ninguno de los centros germinales el precipitado granular rojo que evidencia la

inmunoreacción de la proteína priónica, además de compararlas con los controles positivos y negativos aportados por un centro de referencia canadiense.

La técnica basada en la biopsia de tejido linfoide de tercer párpado ovino, demostró la factibilidad de ser realizada en condiciones de laboratorio país, lo cual podría entregar información precoz sobre el estado sanitario de la masa ovina en lo referido a Scrapie.

En este trabajo se logró la obtención de tejido linfoide de tercer párpado viable de ovinos, su clasificación y con ello validar y estandarizar la IHQ en este tejido a partir de muestras obtenidas *in vivo*, lo que demuestra la aplicabilidad y la capacidad de usar esta nueva herramienta diagnóstica en la masa ovina nacional, para así ser utilizada como técnica *in vivo* de *screening*, en programas de vigilancia, diagnóstico y control de Scrapie en Chile.

ABSTRACT.

Scrapie is a neurodegenerative disease caused by prions that affects sheep and goats, described since the eighteenth century. The prion is an abnormal protein that spreads through the body changing the normal isoform of the host protein. The most characteristic pathological lesion is the vacuolization, either in the neuronal soma or neuropil.

The identification of suspicious individuals is the first step in the monitoring program for this disease. Immunohistochemical technique is used to demonstrate the pathological protein deposition in the nerve tissue, such as the óbex. However, this procedure must be made after the death of the animal, limiting the diagnostic. For that reason, an early diagnostic tool that allows identifying preclinical stages of the disease is need; indeed, the biopsy of the third eyelid lymphoid tissue, has been described for *in vivo* studies of Scrapie in sheep and goats.

Taking this background into account, a study with live animals from the Metropolitan Region of Chile was conducted, in order to standardize the immunohistochemical technique (IHQ) and develop an *in vivo* protocol suitable for laboratory conditions. Chile has been declared free of Scrapie, to maintain this status the Agricultural and Livestock Service of Chile (SAG) has post mortem diagnostic tools namely IHQ, histopathology, Western Blotting and ELISA..

In the present study 75 sheep over 2 years old were sampled, from each animal the third eyelid lymphoid tissue was excised and this tissue was stained with Hematoxylin- eosin (H-E) in order to classify its suitability according to the number of germinal centers. From the total of samples, 50 were classified as suitable to continue to the IHQ technique, which represent the 66.6% of sampled animals, thus the number of germinal centers of lymphoid tissue needed to diagnose a negative sample should be equal to or greater than 4.

All of the samples tested by IHQ were negatives to Scrapie, because they did not show evidence of immunoreaction to the prionic protein, expressed by a granulated red

precipitate, in none of their germinal centres. In addition, these samples were compared with positive and negative controls provided by a Canadian reference centre.

The technique based on the biopsy of third eyelid lymphoid tissue of sheep demonstrated the feasibility to be performed under common Chilean laboratories conditions, which could provide early information regarding to the Scrapie status in sheep flocks.

Samples of viable lymphoid tissue of the sheep third eyelid were obtained and classified in this research, allowing the validation and standardization of IHQ technique of this tissue through samples obtained *in vivo*, this demonstrates the suitability of this technique to be included as new diagnostic tool within the *in vivo* screening in surveillance, diagnosis and control programs of sheep Scrapie in Chile.

INTRODUCCION.

El Scrapie ovino o “Tembladera,” es una enfermedad degenerativa del Sistema Nervioso Central (SNC), que se caracteriza por presentar un largo período de incubación, sintomatología neurológica, curso progresivo subagudo o crónico y un final fatal. Es considerado como el prototipo de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), que se conocen desde hace más de 250 años. Es endémica en diversas regiones europeas y de EEUU.

Las EETs son enfermedades neurodegenerativas producidas por priones, el agente es una forma alterada de una proteína celular normal que ha perdido su función fisiológica, pero que ha adquirido la capacidad de agregarse y de transformar la forma normal en patológica. Afectan a animales tanto domésticos como salvajes y también al humano; el cuadro clínico incluye cambios en el comportamiento, además de la tendencia a rascarse y frotar su cuerpo, para aliviar el prurito. Las lesiones del SNC, consisten en astrogliosis, vacuolización intracelular, pérdida de neuronas y formación de placas amiloides, que permiten el diagnóstico. La vía de infección más conocida y probada, incluso experimentalmente, es la vía oral.

La gran epizootia de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) en Gran Bretaña, detectada en 1986, que afectó a más de 200 mil animales creó una enorme preocupación entre los consumidores europeos y desencadenó la primera crisis de “*las vacas locas*” a nivel mundial, principalmente por la transmisión del prión proveniente de EEB a los humanos, como una variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD).

La mejor medida preventiva y la más segura frente al Scrapie, es eliminar toda posibilidad de infección evitando la incorporación de animales enfermos o infectados en el período de incubación, lo cual es difícil de detectar, una de estas medidas es la de impedir el ingreso al territorio nacional de ovinos procedentes de países que presentan la enfermedad. Así los métodos diagnósticos de las EETs, se basan en la observación de las lesiones mediante microscopía óptica o en la detección de la proteína alterada PrP^{sc} y se realizan en muestras

del SNC obtenidas *post mortem*, lo que los limita para realizar un programa de control de esta encefalopatía, por su tardía aplicación.

La patogenia de esta enfermedad muestra que la PrPsc, se puede detectar en el tejido linfoide de animales afectados por Scrapie, incluso antes de que se desarrollen los síntomas clínicos de la enfermedad y de que la PrPsc alcance el SNC. Así, algunos estudios informan de un método útil que detecta la presencia de PrPsc por IHQ en los folículos linfoides de la membrana nictitante (tercer párpado) de ovinos con Scrapie clínico y en otros clínicamente sanos. La ventaja de este método radica en la facilidad de obtener el tejido para la biopsia, lo que se puede realizar con anestesia local, en contraposición a otras biopsias más invasivas, mostrándose éste como un método útil y sobre todo práctico de realizar en animales vivos.

En esta memoria de título se buscó demostrar la factibilidad y eficacia de la aplicación de la inmunohistoquímica (IHQ) en el tejido linfoide de tercer párpado de ovinos *in vivo*, como método de diagnóstico preclínico que permita realizar un control preventivo en los animales del país.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

Generalidades de enfermedades priónicas.

En 1982 Prusiner propuso el nombre de "prión", para el agente causante de un grupo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (Torres *et al.*, 2001; Mandujano *et al.*, 2006). Dado el carácter infeccioso de dicho agente, se supuso que este debía contener al menos un tipo de ácido nucleico, dado que, según el dogma central de la biología molecular, de estas biomoléculas depende la única forma viable de reproducción. Contrario a esto, utilizando técnicas moleculares se logró determinar la naturaleza del agente etiológico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), y se denominó como "Prion", apócope de *proteinaceous infectious particle* a la molécula cuyo único componente conocido es una proteína (Mandujano *et al.*, 2006).

La naturaleza exacta del agente transmisible fue controversial, aunque muchos experimentos apoyaban la hipótesis "solo proteína", la cual postula que el agente estaba desprovisto de ácidos nucleicos y consistía en una conformación anormal o proteína priónica patológica (PrPsc), isoforma de la proteína celular (PrPc) codificada por el hospedero. En esta hipótesis, la PrPsc convierte a la PrPc en otra PrPsc con el cambio conformacional postulado (Davies *et al.*, 2004; Kratzel *et al.*, 2007). Así, la propagación priónica representa una variedad de fenómenos fisiopatológicos, que fueron reconfirmados con la generación de infección artificial, que además, proporcionó la evidencia de la hipótesis "solo proteína" (Ryou, 2007).

Clásicamente, estas enfermedades están asociadas a un acúmulo anormal de esta proteína en el SNC y a una triada de lesiones histológicas que incluyen vacuolización, pérdida neuronal y astrocitosis (McGovern y Jeffrey, 2007). Las EETs, presentan formas etiológicas distintas: hereditarias, esporádicas y también infecciosas a diferencia del resto de las enfermedades neurodegenerativas reportadas hasta ahora (Mandujano *et al.*, 2006).

La presencia del gen que codifica para esta proteína en el genoma del hospedero y la ausencia de respuesta inmune contra el prión, confirma que el agente causal es una forma

anormal de una proteína. Este descubrimiento se contrapone al principio biológico que establecía que la secuencia de aminoácidos de una proteína, determina el plegamiento o estructura terciaria de ésta, porque en la actualidad se conoce que existen al menos dos isoformas del prión, cuyas estructuras son termodinámicamente estables como para mantenerse en condiciones fisiológicas. Además, no se ha encontrado diferencias químicas, ni de estructura covalente entre ambas isoformas (Mandujano *et al.*, 2006).

La conversión corresponde, a un evento postraducciona que ocurre después de que la PrPc, ha alcanzado su posición en el dominio extracelular de las membranas neuronales, o incluso, mucho después, durante el transporte vesicular de la proteína al interior de la neurona (Davies *et al.*, 2004; Mandujano *et al.*, 2006). La PrPc se codifica por un único gen llamado PRNP presente en los mamíferos, aves e incluso en los reptiles; la secuencia de aminoácidos se ha mantenido en la escala filogenética. Se presenta en el tejido nervioso, muscular y en células del sistema inmunitario. La mayor concentración de PrPc ha sido reportada en las neuronas, particularmente en las membranas pre y post-sinápticas, lo que sugiere que posee importancia en el funcionamiento de éstas. Las funciones biológicas de PrPc permanecen poco claras. Sin embargo, dado que su secuencia aminoacídica es altamente conservada entre las especies, se sugiere que posee especial importancia en procesos fisiológicos (Mandujano *et al.*, 2006; O'Rourke *et al.*, 2011). Se ha descrito que la PrPc liga iones de cobre y que este estimula la endocitosis de la PrPc desde la superficie celular de manera rápida e irreversible. Esto abre la posibilidad de que la PrPc funcione como receptor celular de Cu. También se ha propuesto que actúe como transductor de señales intracelulares para la protección neuronal, en este proceso involucraría moléculas como el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y fosfocinasas (Mandujano *et al.*, 2006).

Como se menciona, la forma normal de la proteína priónica PrPc, se encuentra en una amplia gama de tejidos y su expresión en el sistema nervioso periférico (SNP) y tejido linfoide parece ser un requisito previo para la transferencia de la infección y la propagación de la enfermedad al sistema nervioso central (SNC) (Ersdal *et al.*, 2003).

La PrPc está acoplada a una cadena de glicosil fosfatidil inositol (GPI) y sometida a N-glicosilación en dos sitios. Las estructuras de la PrPc de ratones, humanos, ganado y hámster comparten características comunes (Aguzzi *et al.*, 2008). La PrPc madura, se encuentra como una proteína glicosilada de 209 aminoácidos con un puente disulfuro. En los animales, el gen de la PrP en sí es ampliamente expresado durante el desarrollo pero con mayor concentración en el adulto y no está limitado a las células neuronales del cerebro. A nivel celular, la PrPc se sintetiza en el citoplasma, se transporta a través del Retículo Endoplásmico y Golgi, para aparecer en la membrana plasmática. El componente proteico de la PrPc se localiza en la matriz extracelular, pero se une a la membrana plasmática por el GPI. La estructura secundaria de la PrPc propuesta por estudios de resonancia magnética nuclear incluye tres α -hélices y dos cortas hojas β (Ryou, 2007).

Las dos isoformas de PrP se diferencian notablemente en sus propiedades químicas y fisiológicas (Fig. 1). La PrPc está formada por un 43% de α -hélice y un 3% de láminas β -plegada. Es un monómero presente en la superficie celular, sensible a la digestión por proteasas y soluble en detergentes. En cambio la PrPsc está formada por un 43% de láminas β -plegada y 30% de α -hélice, que tiende a agregarse para formar oligómeros insolubles, es parcialmente resistente a la degradación por proteasas e insoluble en presencia de detergentes (Mandujano *et al.*, 2006; Aguzzi *et al.*, 2008).

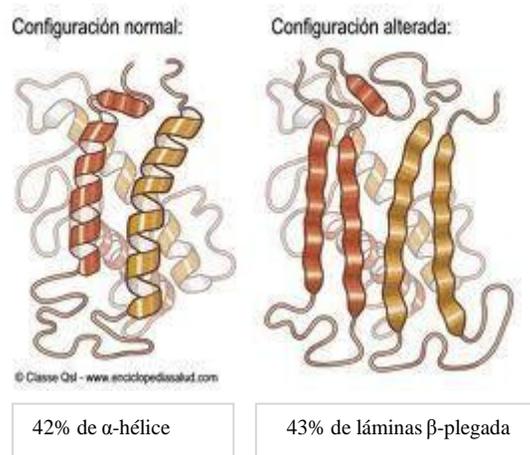


Figura 1: Esquema del cambio conformacional de la proteína priónica.

El núcleo PK-resistente de PrPsc se denota como PrPres. Es de uso frecuente para la detección de enfermedades priónicas y sus características moleculares son útiles para caracterizar el tipo de enfermedad en casos individuales. La variación en la escisión por la proteinasa K (PK), también da lugar a cambios en el perfil de inmunoreactividad de la PrPres, como epítomos clave, que pueden estar presentes o ausentes en el núcleo PK-resistente. Los diferentes tipos de enfermedad priónica, también puede variar según la estabilidad conformacional de la PrPres (Dudas *et al.*, 2010).

Debido a la existencia de distintos mecanismos de adquisición de las EETs, hereditario, esporádico e infeccioso, se han propuesto varias teorías que pretenden explicar el cambio conformacional. Una de estas corresponde a la desestabilización de la PrPc debida a mutaciones del gen PRNP, las variantes hereditarias se deben a mutaciones puntuales en este gen que se manifiestan en la sustitución de un aminoácido por otro, o por la inserción de repeticiones de aminoácidos en múltiplos de ocho. Prusiner sugirió que la presencia de estos podría desestabilizar la estructura terciaria de la proteína, que la hélice afectada y sus vecinas se pliegan nuevamente constituyendo estructuras en lámina β -plegada. En la actualidad, están caracterizadas alrededor de 30 mutaciones en las EETs heredadas, sin embargo, únicamente 10% de los casos reportados de EETs son de origen hereditario, por lo que la mayoría son esporádicas o infecciosas y no presentan mutación en el gen, ni alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Mandujano *et al.*, 2006).

Por esta razón, esta teoría no está lo suficientemente argumentada como para explicar el cambio conformacional del 90% de los casos. Otra teoría corresponde a interacciones moleculares entre PrPc y PrPsc, e incluye dos modelos de explicación: El primero se denomina de nucleación, sugiere que la isoforma “normal” se encuentra en equilibrio conformacional con la isoforma patológica o con un precursor de esta. Aunque la estructura de PrPc es favorecida, el cambio conformacional es un proceso estocástico que ocurre cuando unas cuantas moléculas de conformación patológica actúan como una semilla o núcleo capaz de inducir el cambio de moléculas normales en aquellas con la conformación anómala y es el resultado de interacciones directas entre la PrPc y la PrPsc. Una vez que se

inicia la transformación, ésta se propaga como una reacción en cadena y debido a la insolubilidad que caracteriza a las moléculas de la PrPsc, éstas se depositan en el citoplasma neuronal formando extensos agregados que dañan a las células. El segundo modelo de plegamiento, propone que la conversión de la PrPc requiere que esta se encuentre desplegada y que se vuelva a plegar de manera anormal, bajo la influencia de una molécula de PrPsc, esto requiere franquear una barrera energética muy grande. La presencia de la PrPsc que iniciaría este proceso, se debería a la infección o a la transformación esporádica de moléculas PrPc. Este modelo ha sido apoyado al reportarse que en estudios *in vitro* la PrPc, conformada mayoritariamente por estructuras α -hélice, es capaz de cambiar espontáneamente de conformación hacia estructuras β plegada, que constituyen la PrPsc. Es un proceso postraduccional, debido a que no se han encontrado diferencias químicas entre la PrPc y la PrPsc, se presume la existencia de otros procesos implicados en el cambio conformacional y en la agregación de la PrP. Uno de los mecanismos de mayor importancia en la fisiopatogénesis de las EETs, es la glicosilación. Los oligosacáridos que están unidos a la PrPc, son N-oligosacáridos, que establecen formas ortogonales con carga negativa. Éstos cubren a la proteína impidiendo, por efecto estérico, las interacciones intramoleculares o intermoleculares. El hecho que la PrP contenga tal variedad de complejos oligosacáridos, sugiere que se modifican las propiedades que distinguen entre la PrPc y PrPsc (Mandujano *et al.*, 2006).

Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en humanos.

En los humanos, la mayoría de las EETs presentan un cuadro neuropatológico que incluye ataxia, temblor generalizado, pérdida de coordinación, alteraciones de memoria, disfunción motora, pérdida de las habilidades cognitivas, demencia progresiva e invariablemente, la muerte. Entre estas se encuentran la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), el Insomnio Familiar Fatal, el Kuru y una variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Yang *et al.*, 2010).

Entre las que se transmiten en forma iatrogénica están el Kuru, CJD iatrogénica y la vCJD. Para el Kuru y la CJD iatrogénica, los individuos se expusieron al agente de la EET por el

consumo o contacto con tejidos nervioso contaminado, mientras que la vCJD, se asocia con la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), sobre la base de datos epidemiológicos y similitudes bioquímicas de las cepas del prion (Aguzzi *et al.*, 2008; O'Rourke *et al.*, 2011).

Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

La Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) es una enfermedad neurodegenerativa rara y fatal, que es causada y transmitida por priones. El sistema nervioso central (SNC) se destruye rápidamente, dando lugar a una rápida progresión de la demencia con múltiples deficiencias neurológicas (Yang *et al.*, 2010).

Aproximadamente el 85% de todas las enfermedades priónicas humanas son formas de CJD esporádica. En los países con una vigilancia meticulosa, la incidencia es de 0,1 a 1,8 casos por millón de personas reportadas al año (Aguzzi *et al.*, 2008).

La CJD, de origen genético, comprende alrededor de 10% de las enfermedades priónicas humanas, se ha asociado con mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en el gen de la proteína priónica. En el cual, existe un deterioro cognitivo leve en que participan los dominios cognitivos ejecutores, sin afectar significativamente a otras funciones como la memoria (Masullo *et al.*, 2010). El período de incubación, tiempo de la exposición al agente hasta la aparición clínica en la CJD iatrogénica es largo, varía entre los 2-10 años y más. Es probable que la introducción directa del agente en el cerebro, puede dar cuenta de las diferencias clínicas, por ejemplo, periodo de incubación y los signos clínicos observados (Aguzzi *et al.*, 2008).

Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD).

En 1996, con el estudio de 10 casos de una nueva EET, en Gran Bretaña se informó que el agente etiológico de la EEB se había extendido a los humanos. El surgimiento de una nueva variante de la CJD probablemente esté relacionado con la ingestión de tejido nervioso, muscular o de médula ósea de ganado infectado (Pirisinu *et al.*, 2011).

Algunos trabajos experimentales han evidenciado la relación entre el agente causal de la EEB y la vCJD, mediante la transmisión exitosa de la EEB a primates no humanos,

encontrándose una estrecha similitud de sus perfiles neuropatológicos (Mandujano *et al.*, 2006).

La vCJD afecta principalmente a adultos jóvenes y clínicamente se caracteriza por progresivos trastornos neuropsiquiátricos que conducen a ataxia, demencia, y movimientos involuntarios (Aguzzi *et al.*, 2008).

La vCJD se diferencia de la CJD por la temprana edad de inicio de la vCJD: 19 a 39 años (CJD: 55-60 años); la duración de la enfermedad en la vCJD es de 7,5 a 22 meses mientras que la CJD va de 2,5-6,5 meses, la ausencia de cambios electroencefalográficos que típicamente se encuentran en CJD y en distintas características neuropatológicas. En la vCJD, se detectan cantidades significativas de proteína patológica priónica (PrPsc) en los tejidos linfoides en la etapa preclínica (Aguzzi *et al.*, 2008).

La proteína priónica normal está distribuida de manera homogénea en todos los tejidos humanos. Sin embargo, en particular en la vCJD, se ha mostrado que la acumulación anormal de la proteína ocurre principalmente, en el tejido linfóide del hospedero, en particular en las células dendríticas foliculares. Se ha sugerido, basándose en estudios con modelos animales, que la progresión de la infección al SNC es gradual, llegando a los niveles máximos durante la enfermedad (Mandujano *et al.*, 2006). En la actualidad, existe la preocupación de que algunos individuos expuestos a la EEB puedan ser portadores asintomáticos de la infección y que estas personas podrían ser un riesgo de transmisión de la infección a otros, a través de transfusiones de sangre, trasplantes de córnea, entre otros (Aguzzi *et al.*, 2008).

Encefalopatías espongiforme en animales.

En los animales, los priones causan la forma más común de este tipo de enfermedades, que es el Scrapie o prurito lumbar en ovejas y cabras. Además producen las Encefalopatías Espongiformes del ganado Bovino (EEB) comunmente conocida como la “*enfermedad de las vacas locas*”, las encefalopatías de ungulados como el venado y el alce, así como la de felinos silvestres y domésticos (Mandujano *et al.*, 2006).

Encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

En la década de los 80', un brote masivo de la EEB dio lugar a graves problemas económicos, sociales y políticos. Durante este período en el Reino Unido, la EEB se encontró en cientos de miles de animales cada año, lo que condujo a daños económico en grandes cifras. A mediados de la década del 90', con posterioridad al pico del brote de la EEB su transmisión a los seres humanos que consumieron alimentos contaminados agravó la situación de pánico en Europa y el mundo. Se hizo evidente que la EEB había cruzado la barrera de las especies y creó una nueva variedad de enfermedad priónica humana la vCJD (Ryou, 2007).

Los perfiles de las lesiones producidas por EEB y los tiempos de incubación en ratones son indistinguibles de aquellos observados en los ratones inoculados con la CJD. La PrPres de estos pacientes y de los animales también mostraron similares pesos moleculares y perfiles de glicosilación en el *Western Blot* (Dudas *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que la EEB es causada por una cepa del prión y que la exposición a este, es la causa más probable de la vCJD humana (Dudas *et al.*, 2010; Pirisinu *et al.*, 2011).

Scrapie.

El Scrapie es una enfermedad que afecta naturalmente a ovejas y cabras desde hace siglos, pertenece al grupo de desordenes neurodegenerativos progresivos y lentos, llamados EETs o enfermedades priónicas, que incluyen la forma esporádica y natural que se presentan en animales y humano (McGovern y Jeffrey, 2007). El Scrapie ovino es el prototipo de este grupo heterogéneo de trastornos asociados a priones (O'Rourke *et al.*, 2000).

Aunque, el Scrapie ha sido descrito por siglos, se le ha dado relativamente poca atención, como una enfermedad natural de ovejas y cabras, principalmente porque el impacto económico que se le asigna es relativamente menor comparado con otras enfermedades de las ovejas. Su importancia ha aumentado enormemente desde la década de 1980 debido a varios factores que han producido el aumento del conocimiento sobre las EETs. Uno de estos fue la epidemia de EEB en el Reino Unido, que se debió probablemente a la exposición de los bovinos al agente del Scrapie, o por el consumo de harina de carne y

hueso contaminada con este. Otro factor crucial, fue el reconocimiento en los humanos de la vCJD que se ha asociado a la exposición humana al agente de EEB (Vargas *et al.*, 2006). Este carácter llamativo de los priones ha generado enormes preocupaciones en materia de salud pública y atrajo la atención de las comunidades científicas (Ryou, 2007).

El Scrapie es una infección adquirida, con un período de incubación que va de 2 a 5 años y un promedio de presentación desde el comienzo de los signos clínicos de 2,5 años (Bravo, 2008). La enfermedad priónica, típicamente exhibe un tiempo muy largo de incubación, período de tiempo entre el infección y la manifestación de signos clínicos (Aguzzi *et al.*, 2003; van Keulen *et al.*, 2008).

Múltiples cepas de Scrapie han sido identificadas en modelos experimentales en ratones gracias a sus diferencias en los periodos de incubación y la neuropatología que presentan. Estas cepas también se han diferenciado por su distribución en los tejidos del hospedero; el perfil de las lesiones; y la conformación de la proteína priónica, glicosilación, resistencia a proteasas y agregación (Loiacono *et al.*, 2009).

El Scrapie clásico es transmisible y contagioso, caracterizado por signos neurológicos variables, cambios espongiiformes clásicos en el cerebro y acumulo de la PrPsc en distintos tejidos (Jeffrey y González, 2007).

Patogénesis.

Se considera que en el Scrapie natural, el tracto gastrointestinal es la principal vía de infección. Los primeros acumulos de la PrPsc se encuentran en las placas de Peyer, en el íleon así como en el drenaje mesentérico de los ganglios linfáticos y tejido linfoide (TL) asociado al intestino, es un punto de entrada para el agente en ovejas (Ersdal *et al.*, 2003). Se ha detectado la acumulación de la PrPsc en el tejido nervioso entérico, al parecer más tarde, pero todavía en una fase temprana de la enfermedad. Además se han encontrado agregados de la PrPsc en otros tejidos linfoides como el bazo, las amígdalas y los nódulos linfáticos retrofaríngeos en el ovino, tanto a nivel clínico como no clínico de la enfermedad,

por lo tanto los sitios más probables de la replicación del prión son estos tejidos mencionados (Ersdal *et al.*, 2003).

Pese a las pruebas convincentes de su transmisión a través de alimentos contaminados, el mecanismo por el cual la PrPsc, cruza la estricta barrera de células epiteliales sigue siendo un enigma (Sunkesula *et al.*, 2010). Los posibles mecanismos incluyen la participación en el transporte con la ferritina en los alimentos ingeridos y absorción por las células dendríticas. Dado que la ferritina es ubicua, se expresa y comparte homología considerable entre las especies, el co-transporte de la PrPsc con ferritina se puede producir en distintas especies con consecuencias nocivas. Se ha utilizado una combinación de modelos *in vitro* e *in vivo* de la barrera intestinal de células epiteliales, para entender el papel de ferritina en mediar la captación de la PrPsc y su transporte (Sunkesula *et al.*, 2010).

A la luz de los resultados, se ha sugerido un modelo de dos fases para la neuroinvasión priónica, después de la captación periférica de agente. Este modelo postula la siguiente secuencia de eventos: primero la reproducción del agente en el TL y luego la neuroinvasión por transferencia de los priones a los componentes de la inervación del TL. Sin embargo, otros hallazgos sugieren que la infección directa del sistema nervioso es posible independientemente del TL, especialmente cuando la infección es causada por una dosis alta del agente (Monleón *et al.*, 2004; Kratzel *et al.*, 2007).

La evidencia circunstancial en ovejas infectadas preclínicamente indica que el destino inicial al cerebro es el mismo, independiente de la vía de inoculación. Estos resultados enfatizan la alternativa de rutas simultáneas o complementarias de neuroinvasión, con un incremento en la duración de la infección y la acumulación de la PrPsc se hace más generalizada. La magnitud y distribución se ven afectadas por la ruta de inoculación, el genotipo de la PrPsc, el hospedero y la cepa de la infección (van Keulen *et al.*, 2008).

Al contrario del SNC, donde las lesiones son bien conocidas y es aceptada la presencia de infección y la acumulación de la PrPsc, no hay patología asociada a las EETs en el sistema

linforeticular. Estudios usando diversas combinaciones de ratones inmunodeficientes y ratones “*knock out*”, señalan que las CDF son necesarias para la propagación del prión dentro del sistema linforeticular. Además macrófagos del sistema linfoide han sido identificados como reservorios del prión del Scrapie (McGovern y Jeffrey, 2007).

Evidencia reciente demuestra que la patología por priones tiene una respuesta inflamatoria altamente atípica, caracterizada por la activación de las poblaciones de macrófagos en el cerebro. Esto sugiere que una inflamación sistémica podría impactar en la inflamación local en el cerebro dañado y exacerbar la síntesis de citocinas inflamatorias u otros mediadores en el cerebro, las que podrían contribuir al proceso crónico degenerativo (Mandujano *et al.*, 2006).

Tejido Linfoide (TL).

En muchos experimentos, los hallazgos sugieren que los linfonódulos regionales actúan como fuente para facilitar la neuroinvasión (Kratzel *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta la participación del TL en la patogénesis Scrapie y la demostración de PrP_c en los componentes celulares de la sangre, pensar en que exista PrP_c en fracciones de membranas de los linfocitos es una expectativa razonable. La evidencia de que los linfocitos T no están involucrados en la patogénesis de la enfermedad, se sugirió por primera vez cuando los estudios mostraron que la timectomía, no tuvo efecto en el período de incubación de la enfermedad después de la infección periférica. Sin embargo, aunque sigue siendo incierto que los linfocitos B estén implicados directa o indirectamente en la patogénesis de las EETs, su participación en el transporte intracorpóreo de la PrP_c parece posible (Carmona *et al.*, 2005).

En las etapas clínicas de la enfermedad, la PrP_c infecta y se acumula generalmente en todo el sistema linfoide con excepción del timo. Este acumulo, se encuentra generalmente asociado a las células dendríticas foliculares (CDF) maduras en los folículos secundarios. Al igual que en ratones, la acumulación de la PrP_c en el sistema linfoide (SL) se asocia con la membrana plasmática de CDF y lisosomas de macrófagos. En todos los experimentos con muestras seriadas, el tiempo entre que los primeros tejidos linfoides y

que los demás sean positivos, es corto. Del mismo modo, el tejido linfoide asociado a la mucosa recto-anal resulta positivo en proporciones similares, a otros tejidos linfoides de ovejas con Scrapie del mismo genotipo e independiente de la ruta de inoculación. Estos datos sugieren, que todo el TL está expuesto a la infección en más o menos el mismo tiempo, probablemente a través de la exposición sanguínea. Con el uso de IHQ en una progresión temporal simple, la PrPsc puede ser reconocida dentro de los folículos: los primeros acumulos son débiles puntos dentro de macrófagos en la zona clara, seguidos por una acumulación curvilínea asociada a las CDF y posteriormente la PrPsc se acumula de forma granular en los macrófagos de la zona oscura. En las etapas más tardías de la presunta infección de folículos secundarios, existe una difusa participación de las redes de CDF en la zona clara y una prominente acumulación multigranular en macrófagos y tejidos adyacentes (Jeffrey y González, 2007).

En un estudio sistemático de tejido linfoide rectal, el 84% de las ovejas clínicamente afectadas tenían al menos 70% de los folículos secundarios con PrPsc, mientras que el 35% y 39% de ovejas preclínicas y clínicas respectivamente, mostraron el 100% de los linfonódulos secundarios afectados. Aunque el inicio de la acumulación de la PrPsc en el TL se produce de manera significativa antes de la enfermedad clínica, la presencia o ausencia de PrPsc en el TL y el tiempo exacto en el que esta acumulación se inicia, varía en función del genotipo, vía de inoculación, la dosis y cepa. Como ya se ha descrito en ratones, ovejas inoculadas intracerebralmente muestran menos PrPsc en tejidos linforeticulares positivos, principalmente los de la cabeza y cuello, mientras que las infectadas por vía intravenosa, involucran más el bazo que los animales desafiados oralmente. En casos de ovejas muy infectadas la acumulación de la PrPsc en los tejidos linfoides no resulta evidente hasta al menos los 8-12 meses de edad (aproximadamente un 33-40% del periodo de incubación). Por lo tanto, la dinámica de acumulación de la PrPsc en el TL y el SNC son diferentes (Jeffrey y González, 2007).

Histopatología.

La patología morfológica de las EETs en ovejas y otras especies ha sido descrita extensamente y se caracteriza por vacuolización y astrocitosis, mientras que la pérdida de

cuerpos neuronales no siempre es visible. Las proporciones de neuropilo y la vacuolización neuronal en su distribución neuroanatómica, pueden diferir según la fuente o la cepa, aunque la variabilidad individual es muy alta. El otro sello distintivo de las EETs en las ovejas es el acumulo de la PrPsc en el cerebro (Grassi *et al.*, 2008). En el SNC el acumulo de la PrPsc está asociado con la destrucción característica de los cuerpos de células neuronales y el desarrollo de una encefalopatía espongiiforme progresiva (Davies *et al.*, 2004).

La presencia de gran cantidad de vacuolas intraneuronales, se debe a la división de la tricapa lipídica de las membranas neuronales, modificación probablemente relacionada con el hecho de que la PrP es una proteína constitutiva de dichas membranas. La acumulación de astrocitos reactivos y de células de la glía hipertróficas, probablemente sea consecuencia del daño neuronal (Mandujano *et al.*, 2006).

El depósito de la PrPsc tiene un patrón reticular en la zona clara de los folículos. El de la inmunotinción para linfocitos, es el mismo para distintos linfonódulos y no hay diferencia entre ovejas con y sin signos clínicos de Scrapie. El patrón de tinción es similar al observado en tejido linfoide de ovejas sanas, por lo tanto, está demostrado que el depósito de la PrPsc en las CDF, no resulta en una destrucción de la arquitectura del centro germinal y/o su función. Sin embargo, no se descarta que niveles de PrPsc considerablemente mayores, puedan ser la causa de una destrucción del centro germinal (Davies *et al.*, 2004).

En estudios recientes se describen diferentes formas de acumulación de la PrPsc, de acuerdo a esto se agrupan en los de membrana-celular (o de acumulación extracelular) y los intracelulares. Los patrones de PrPsc membrana celular están asociados al neuropilo, a células gliales o perivasculares, relacionadas con células endoteliales o asociadas a células endoteliales como placas vasculares. Los de acumulo de la PrP intracelulares son el intraneuronal y el intramicroglial (Jeffrey y González, 2007).

Determinación genética.

La PrP celular es codificada en el locus del gen PrP^{NP} del genoma de la especie. Este gen PrP, se ha puesto de manifiesto en diferentes especies animales. Así, el gen humano incluye un solo marco de lectura abierta que codifica una proteína compuesta de 253 residuos de aminoácidos (Ryou, 2007).

En los ovinos, la susceptibilidad al Scrapie es parcialmente controlada por el gen “PrP”. Los principales sitios asociados a la susceptibilidad o resistencia son los codones 136 que codifica para alanina (A) o valina (V), el 154 que codifica para arginina (R) o histidina (H) y 171 que codifica para R, glutamina (Q) o (H). En general la patogénesis del Scrapie típico, es genotipo dependiente, el genotipo heterocigoto ARR está asociado con resistencia, mientras que VRQ y ARQ están asociados con susceptibilidad (Davies *et al.*, 2004; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011).

La magnitud de la acumulación de la PrP^{Sc} depende del genotipo y del período de incubación: por ejemplo, en la infección de la EET intracerebral, los niveles totales de PrP^{Sc} son similares en animales ARQ/ARQ y VRQ/VRQ, clínicamente afectados pero estos últimos tienen un tiempo de incubación mayor, similar al de ovinos ARR/ARR, que sin embargo, muestran magnitudes de acumulación mucho menores de PrP^{Sc} (Jeffrey y González, 2007).

En los VRQ/VRQ, la acumulación de la PrP^{Sc} se observa tempranamente en tejido linfoide asociado a intestino, a los 2-3 meses de edad en Scrapie natural y entre la 3-5 semanas en experimento vía oral (Davies *et al.*, 2004). Mientras que ovejas Poll Dorset VRQ/ARR con signos clínicos de Scrapie, presentan invasión del SNC sin infección previa del tejido linfoide (Kratzel *et al.*, 2007). Lo que sugiere que las ovejas VRQ/ARR con Scrapie, son menos capaces de soportar un acumulo periférico de PrP^{Sc} en el sistema linforeticular (Davies *et al.*, 2004).

La diversidad de perfiles de acumulación de la PrP^{Sc} que se han descrito en los cerebros de ovejas, son el resultado de diferentes tropismos celulares y del procesamiento entre las

diferentes cepas del prión. Las diferencias descritas entre las cepas de EETs ovina, corresponden en general a la migración de los fragmentos aglicosilados de PrPsc (Jeffrey y González, 2007).

Ovejas homocigotas para VRQ cuentan con participación más temprana y extendida del TL; la PrPsc puede ser detectada en las placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos, ya entre los 2 a 4 meses de edad en un rebaño infectado, seguido de un aumento rápido y progresivo en la acumulación en todo el TL (Terry *et al.*, 2009).

Características clínicas.

Los síntomas se clasifican en generales, de comportamiento, locomotores y neurológicos, que están directamente relacionados con las áreas del SNC afectadas y la presentación de la enfermedad. Esta puede diferir de acuerdo a la zona geográfica; por ejemplo, en Reino Unido el prurito es el signo más común, en cambio la debilidad y pérdida de peso no siempre son observadas, mientras que en los EEUU e Irlanda, son distintivos de Scrapie una pobre condición corporal, temblor de la cabeza y la ataxia, pero el prurito es sutil. En España, está caracterizada por cambios de comportamiento, anomalías en la marcha y prurito, pero muestra un lento y progresivo curso de 6 meses, desde el comienzo de los signos clínicos (Vargas *et al.*, 2006; Konold *et al.*, 2007).

El prurito y la ataxia se describen como característicos en ovejas con Scrapie en el Reino Unido, sin embargo estos pueden estar ausentes en algunas ovejas con lesiones características de Scrapie avanzado, que pueden morir sin signos clínicos manifiestos. Cuando los signos neurológicos se presentan al final del período de incubación, las deficiencias locomotoras se dan en un corto periodo, sin embargo otros pueden manifestarse relativamente temprano, como las anomalías del ritmo cardiaco, de las tasas de rumiación y la pérdida de peso (Jeffrey y González, 2007; O'Rourke *et al.*, 2011). Los otros signos neurológicos incluyen en ocasiones el rechinar de dientes, postura anormalmente baja de la cabeza, temblores, ataques pseudo-epilépticos y ceguera. Además pueden observarse reacciones de hiperestesia a sonidos, tacto o movimientos. La pérdida progresiva de peso podría estar asociada a una disminución de la rumia, que acontece en la

mayoría de los casos. Algunas ovejas afectadas prefieren los concentrados en lugar del heno, permanecen más tiempo en posición de decúbito y reducen las interacciones sociales con otras ovejas. Sin embargo, estos cambios conductuales, son difíciles de controlar en condiciones de campo (González, 2002; Jeffrey y González, 2007).

La enfermedad sintomática se puede dividir en etapas clínicas como son temprana, media y final, esto a partir de los signos que muestran una importante frecuencia en el examen clínico y que se consideran representativos (Vargas *et al.*, 2006).

En la etapa temprana los signos más significativos son hipoestesia en los miembros, alteración del estado mental y una condición corporal normal. La hipoestesia o incluso la anestesia total, se observa principalmente en el extremo distal de los miembros (Jeffrey y González, 2007). La alteración del estado mental se caracteriza sobre todo por los signos excitatorios. Además, se observan pequeños cambios de comportamiento tales como ansiedad y tendencia a evitar el encierro. Otros signos clínicos pueden estar presentes, pero su frecuencia no es suficientemente significativa para ser considerado representante de esta etapa (Vargas *et al.*, 2006).

En la etapa media se intensifican los valores de los signos representativos, observados durante la primera etapa, con un aumento en frecuencia de la hiporreflexia en los miembros, arritmia cardíaca, prurito, pérdida de lana y el reflejo de mordisquear, que así llegaron a ser significativos para esta segunda etapa. La hiporreflexia en los miembros se hace más constante en los miembros posteriores (reflejos patelares y flexor posterior) más que en los miembros anteriores. La arritmia cardíaca se caracteriza por una alteración en del ritmo cardíaco en descanso que desaparece en ejercicio, por lo que se clasifica como arritmia cardíaca del seno. El prurito se observa principalmente en las áreas de la grupa y la cola, pero también se detecta en la cabeza, tórax y los lados internos y externos de los miembros posteriores, a veces, este es solo un signo sutil, observable solo indirectamente, como pérdida de lana en las áreas antes descritas (Vargas *et al.*, 2006).

En la última etapa de la enfermedad, todos los signos clínicos descritos en las etapas tempranas y medias continúan presentes, con valores crecientes. Por otra parte, los temblores de la cabeza, hiperexcitabilidad a los estímulos externos, ataxia o las anormalidades del paso y el rechinar de dientes tienen valores aumentados, llegando así a ser representativos de esta última etapa. Los temblores de la cabeza se caracterizan por contracciones mioclónicas que causan movimientos intermitentes. En esta etapa, la mayoría muestra signos depresivos con postración permanente, ataxia o anormalidades en el paso, que son caracterizadas por un paso alargado de los miembros posteriores, un salto de los miembros anteriores (salto de conejo) e hipermetría, que progresa a ataxia de miembros posteriores, ataxia generalizada, carencia de equilibrio, caídas y finalmente inhabilidad total de levantarse (Vargas *et al.*, 2006).

Diagnóstico.

La detección de la PrPsc puede realizarse por diversos métodos, incluyendo la inmunoquímica, el *western blot*, el ELISA y diferentes ensayos inmunoenzimáticos en homogenizado de cerebro e inmunohistoquímicos en secciones de tejido. Mientras, los métodos inmunoenzimáticos llamados “pruebas rápidas”, son usadas para el monitoreo activo de las EETs en ovejas, la inmunohistoquímica es considerada oficialmente como la prueba confirmatoria (Jeffrey y González, 2007).

Otra técnica, es la detección de las denominadas fibrillas asociadas al Scrapie (SAF), mediante examen de extractos purificados de material encefálico en el microscopio electrónico. Por su complejidad y requerimientos, esta técnica ha quedado relegada al examen de material en estado de avanzada autólisis. También el *immunoblotting* puede aplicarse con ciertas garantías a este tipo de muestras y ambas, cuando el tejido destinado a estudios morfológicos ha sido congelado en vez de fijado (González, 2002).

Sin embargo, estas técnicas son cada vez más utilizadas para obtener información adicional, sobre la diversidad de cepas de estas enfermedades, el papel del hospedero y los factores medioambientales en los fenotipos de las EETs. En las etapas clínicas de la enfermedad, se pueden definir fenotipos IHQ en cerebro de las ovejas afectadas por EETs, sobre la base de

la inmunorreactividad de anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de la PrPsc y del reconocimiento y calificación de diferencias morfológicas y topográficas. Estos dos enfoques se denominan, respectivamente, mapeo de epítomos y perfilado de PrPsc (Jeffrey y González, 2007).

La espectroscopia es apoyada por la demostración de una clara correlación entre el contenido de hoja beta y la presencia de la enfermedad priónica, e incluso entre este y la fase de progresión de la enfermedad. Sólo algunas enfermedades neurodegenerativas que afectan al SNC, implican la formación de placas amiloides estructuradas por proteínas ricas en láminas beta. Los hallazgos en espectroscopia descritos en algunos trabajos podrían constituir un gran avance en el diagnóstico de EETs, además de las consecuencias socioeconómicas que la aplicabilidad de esta prueba podría tener en el campo de los animales y también importantes repercusiones en la medicina humana, debido a la falta de confianza en los métodos actuales para la prevención de la transmisión de humano, a través de transfusiones de sangre o productos sanguíneos (Carmona *et al.*, 2005).

Los estudios realizados sobre la patogenia de la enfermedad, muestran que la proteína patológica PrPsc, se puede detectar en el tejido linfoide de animales afectados de Scrapie antes de que se desarrollen los síntomas clínicos y que la PrPsc alcance el SNC (Monleón *et al.*, 2007). Sobre la base de estas observaciones, se han propuesto pruebas de diagnóstico preclínico *postmortem* y *antemortem*, basadas en la detección de PrPsc en el tejido linfoide periférico (O'Rourke *et al.*, 2000). El estudio del tejido linfoide, es una importante herramienta para estudios patológicos de Scrapie en etapas clínicas y preclínicas de la enfermedad, pero estudiar los tejidos linfoides disponibles *in vivo* también puede ser muy útil, para el estudio de la evolución clínica de los animales afectados (Vargas *et al.*, 2006).

Inicialmente se usó como muestra para pruebas *ante mortem* la tonsila palatina, investigaciones más recientes han sido exitosas al usar biopsias de tejido linfoide de recto, que es más accesible, lo cual ha sido desarrollado como un potencial método rápido de *screening* (Jeffrey y González, 2007).

Bajo estas condiciones, ensayos inmunohistoquímicos de tejido linfoide periférico con reactivos estandarizados pueden permitir el *screening* de rebaños de ovejas vivas, para así eliminar selectivamente ovejas clínicamente normales de los canales de matanza para consumo, que presentan el prión. Las muestras utilizadas para necropsia incluyen el óbex, las amígdalas y linfonódulos retrofaringeos. La membrana nictitante o tercer párpado, se ha propuesto como una fuente accesible de tejido linfoide en animales vivos, debido a su gran concentración priónica, además se puede recoger bajo anestesia local (O'Rourke *et al.*, 2000).

Basada en estas pruebas, el tejido linfoide como diagnóstico preclínico es factible para el subconjunto de las EETs en las que la PrPsc se acumula en los ganglios linfáticos al comienzo del período de incubación, en particular de la especie ovina y caprina, la caquexia crónica de venado y la variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. El valor diagnóstico de las pruebas de detección de Scrapie basado en su búsqueda en tejido linfoide, dependerá del nuevo concepto en la patogénesis de la enfermedad, que incluyen la interacción de: diferencias entre razas, genética del hospedero, dosis y vía de infección, además de la cepa del agente, del grado de participación del tejido linfoide y de los tejidos del SNC. La prueba de tercer párpado para la PrPsc en animales vivos es una práctica, que una vez estandarizada será de utilidad para el diagnóstico de Scrapie, en los programas de vigilancia y en estudios de investigación para determinar la transmisión, epidemiología y patogenia de las EETs (O'Rourke *et al.*, 2000).

La especificidad de los métodos de diagnóstico del Scrapie, mediante la detección de la PrPsc utilizando tejido linfoide obtenido por biopsia, de tercer párpado o de mucosa rectal, muestra un 100% de eficiencia respecto a las técnicas de confirmación *post mortem* reconocidas por la OIE (Monleón *et al.*, 2007).

Finalmente, el ensayo biológico o la infección experimental, es el único método que, además de permitir la confirmación diagnóstica, proporciona datos sobre infecciosidad real. Sin embargo, su lentitud y elevado costo, convierten al ensayo biológico en una alternativa diagnóstica muy poco viable (González, 2002).

En humanos en tanto, el desarrollo de una prueba de sangre para el diagnóstico de la vCJD es ahora una prioridad, en primer lugar para hacer transfusiones de sangre segura, y en segundo para identificar a las personas afectadas, para que se pueda iniciar un tratamiento temprano antes de la neuroinvasión y el inicio de los primeros signos clínicos (Grassi *et al.*, 2008).

Diagnostico diferencial.

El diagnóstico clínico del Scrapie a nivel individual es 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 (González, 2002).

El Scrapie que usualmente causa signos neurológicos que son de distribución asimétrica o focal, puede ser confundido con otras enfermedades neurológicas (Tabla 1), o con aquellas que causen pérdida de condición corporal progresiva (Tabla 2) o prurito con lesiones de la piel (Tabla 3). Además la presencia de otras enfermedades como toxemia de la preñez o enfermedades de la piel no descarta la ausencia de Scrapie (CRL, 2007).

Tabla 1: Enfermedades neurológicas.

ETIOLOGIA	NOMBRE
Infeciosa	Encefalomiелitis virales: enfermedad de Aujeszky, enfermedad de Borna, Maedi/visna, rabia, meningo-encefalomiелitis bacterial, abscesos epidurales (listeriosis), encefalomalacia simétrica focal (<i>Clostridium perfringens</i>), meningo-encefalomiелitis fúngica (<i>aspergillus</i> , <i>criptococcus</i>), encefalomiелitis protozoarias (<i>toxoplasma</i> , <i>sarcocistis</i>) y migración parasitaria (<i>Coenurus cerebralis</i>).
Metabólica	Toxemia de la preñez, complejo hipocalcemia-hipomagnesemia, encefalopatía hepática.
Congénita	Distrofia muscular progresiva congénita ovina*, lipofuscinosis ceroide*, abiotrofia cerebelar*, gangliosidosis GM1 ovina.
Neoplásica	Tumor (cerebral o medular).
Nutricional	Deficiencia Vit A, enfermedad del musculo blanco*, necrosis cerebro cortical*, deiciencia de cobre, acidosis ruminal.
Tóxica	Botulismo, tetania, toxinas varias (mercurio, plomo, plantas tóxicas, organofosforados).
Trauma	Injuria espinal, subluxación vertebral.
Idiopático	Mielopatía degenerativa torácica, jorobas.

Tabla 2: Pérdida de peso/ Caquexia.

ETIOLOGIA	NOMBRE
Infeciosa	Leucosis, paratuberculosis, pseudotuberculosis, endoparásitos
Nutricional	Mal nutrición energética o proteica, deficiencia de cobalto.
Miscelánea	Enfermedad dental, dilatación abomasal o defecto en el vaciamiento.

Tabla 3: Enfermedades dérmicas.

ETIOLOGIA	NOMBRE
Infeciosa	Sarna, dermatosis parasitaria, miasis cutánea, dermatomicosis, dermatitis bacteriana.
Alérgica	Dermatitis alérgica.
Miscelánea	Fotodermatitis.

Tablas 1-3: Listado de los principales diagnósticos diferenciales de Scrapie. Enfermedades que generalmente ocurren en animales jóvenes (*), están en la lista debido a que la enfermedad ha sido reportada en animales menores de un año de edad (CRL, 2007).

Cepa Nor 98.

En 2005, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA) publicó una clasificación de las EET en pequeños rumiantes, dividiendo el diagnóstico en tres: tembladera clásica, EEB en pequeños rumiantes y Scrapie atípico (Nor 98), como se ilustra en la siguiente tabla (Benestad *et al.*, 2008).

Tabla 4: Categorización de EETs en pequeños rumiantes. Tabla adaptada de EFSA. (Benestad *et al.*, 2008).

Tipo de EET	Western Blot estricto	Proteína K suave y Western Blot	Inmunohistoquímica e histopatología	Comentarios
Scrapie clásico	Patrón de tres bandas sobre 15 kDa	Patrón de tres bandas sobre 15 kDa	Vacuolización en materia gris, inmuno-etiquetado en la medula envolviendo el DMNV(*)	Genotipo susceptible, de 2-5 años de edad.
BSE en pequeños rumiantes	Patrón de tres bandas. Dominancia de la banda di-glicosilada. No, o débilmente teñida con mAb levantado hacia el N terminal. La banda no glicosilada mas baja que en el Scrapie clásico.	Patrón de tres bandas. Dominancia de la banda di-glicosilada. No, o débilmente teñida con mAb levantado hacia el N terminal. La banda no glicosilada más baja que en el Scrapie clásico.	Vacuolización en materia gris, inmuno-etiquetado en la medula envolviendo el DMNV(*)	
Atípico/Nor 98	Negativo o muestra un perfil distinto al western Blot obtenido con otras EET	Múltiples patrones de bandas con una banda mas baja, inferior a los 15 kDa	No envuelve el DMNV(*). La inmunohistoquímica a menudo está presente en el núcleo del tracto espinal del nervio trigémino. La inmunotinción generalmente es más intensa en la corteza cerebral y la cerebelar.	Generalmente ovejas mayores (4 años o mas). genotipos asociados con resistencia al Scrapie clásico. Mas a menudo casos únicos por rebaño.

*DMNV: Núcleo motor dorsal del nervio vago.

En 1998, una cepa nueva y única de agente de Scrapie fue encontrado en ovejas procedentes de Noruega y fue identificada como la cepa Nor 98 de Scrapie. Desde el primer informe de Nor 98 en 2003, esta cepa ha sido identificada en numerosos países, como Bélgica, Alemania, Francia, Irlanda, Reino Unido, Suecia, Portugal, Países Bajos, Lituania, Italia, Estonia, Dinamarca, Islas Malvinas, Suiza, Islandia y Noruega y se le ha dado varios nombres, tales como Nor98-like, atípico y Scrapie no clásico. Recientemente, esta cepa también se ha identificado en el ganado caprino y a pesar de los diferentes nombres asignados a esta variedad de agente de Scrapie, hasta la fecha no se han informado subcepas (Loiacono *et al.*, 2009).

Las ovejas afectadas muestran fundamentalmente ataxia, ausencia de prurito y los hallazgos neuropatológicos se limitan a la corteza cerebelosa y cerebral, mientras la vacuolización y la acumulación del prión en el tronco cerebral a nivel de la óbex es escasa o inexistente (Konold *et al.*, 2007; Loiacono *et al.*, 2009), no se ha observado acumulación de la PrPsc en el tejido linfoide (Loiacono *et al.*, 2009).

Scrapie Nor 98, ha sido reconocido sobre todo por métodos de vigilancia aplicados a animales de reposición y por lo tanto, la información es limitada (Jeffrey y González, 2007). Además, el que sean detectados por vigilancia activa de Scrapie en animales aparentemente sanos sacrificados o en los animales muertos, implica que o bien no mostraron signos clínicos o que presentan signos que por lo general no se asocian con el Scrapie (Konold *et al.*, 2007).

En los casos de Nor 98, el tipo de depósito de la PrPsc observado mediante técnicas de inmunohistoquímica, se ha presentado desde un punteado muy fino a gruesos depósitos granulares y se observan tanto en la materia gris como en la sustancia blanca. No se ha reportado tinción intraneuronal, en contraste con la mayor parte de los aislados del Scrapie clásico. La estructura primaria afectada en el Scrapie clásico, el núcleo motor dorsal del vago (DMNV) no se ha visto afectado, mientras que la intensidad de la inmunotinción de PrPsc observada en el bulbo raquídeo, es generalmente mucho menor en los casos de Scrapie, en comparación con la forma atípica Nor 98 (Benestad *et al.*, 2008).

Similares casos "atípicos" de Scrapie, se han encontrado en muchos otros países y principalmente en ovinos de genotipos que no se asocian con el Scrapie clásico. Estudio de la transmisión de Scrapie atípico en ratones transgénicos que expresan PrP ovina, confirmaron la naturaleza infecciosa de la enfermedad y sugieren que los casos atípicos, son causados por una cepa única (Konold *et al.*, 2007).

El diagnóstico de Scrapie Nor 98 se basa, en la identificación de la PrPsc en regiones como el núcleo espinal del cerebelo y el nervio trigémino mediante IHQ (Loiacono *et al.*, 2009).

La epidemiología muestra que Scrapie Nor 98 está presente en toda Europa, en alrededor de 1/10.000 ovejas de la población, con independencia de la presencia simultánea del Scrapie clásico (Jeffrey y González, 2007). La vigilancia activa intensiva, ha conducido a la detección de estos casos en la mayoría de los países europeos así como, en las islas Malvinas y en América del Norte (Benestad *et al.*, 2008).

Estudios que han comparado la prevalencia de Nor 98 y Scrapie clásico, en 20 países europeos reportaron que, aún cuando la prevalencia general es baja con respecto al clásico, el Scrapie Nor 98 está presente en forma relativamente constante en todos los países participantes de los estudios (Loiacono *et al.*, 2009).

Epidemiología.

El Scrapie se reconoció por primera vez en Estados Unidos (EEUU) en 1947 y desde 1952, el departamento de agricultura de EEUU (USDA) ha trabajado para controlar y erradicar esta enfermedad. La vigilancia del USDA, está diseñada para identificar los rebaños infectados utilizando un enfoque genético para determinar que animales están expuestos o restringidos. Entre los años 2002 y 2003, realizaron un estudio nacional para determinar la prevalencia de Scrapie en las hembras maduras de reposición y los resultados indican, una estimación de la prevalencia en 0,2% en las ovejas maduras (Loiacono *et al.*, 2009).

En la Unión Europea en tanto, se ha informado de casos clínicos; encuestas de animales hallados muertos en la granja y de los animales sacrificados para el consumo humano (encuestas de matadero). Sin embargo, la interpretación de los datos de vigilancia es complicada por una serie de factores, por ejemplo, la falta de notificación de casos

sospechosos, la dependencia de la probabilidad de detectar un animal infectado en el escenario de incubación y el genotipo (Gubbins *et al.*, 2010). En estos países el Scrapie es de declaración obligatoria desde Enero de 1993 (González *et al.*, 2008).

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 indemnidad gracias a rigurosas medidas preventivas. Debido a la ausencia de protocolos de vigilancia, el status de numerosos países con respecto al Scrapie es desconocido (González *et al.*, 2008).

Control y erradicación.

El reconocimiento clínico de los posibles casos de Scrapie es el primer paso y el más importante, en la correcta implementación de programas de vigilancia con el propósito del control y erradicación de la enfermedad (Vargas *et al.*, 2006).

El programa de control de Scrapie en Europa, se basa principalmente en la detección de los animales infectados, mediante el análisis *post mortem* de los sospechosos y de una muestra aleatoria de la población. Además de la consiguiente eliminación de los rebaños infectados o de los animales con genotipos susceptibles y de un programa de selección genética, que consiste en el incremento de la frecuencia del alelo ARR y la disminución o eliminación del VRQ (Monleón *et al.*, 2007). Así, resultados generales concluyen que un aumento en la proporción de AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ, llevaría a esperar un aumento significativo de casos de Scrapie en las explotaciones afectadas (Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011). Tras más de 4 años de aplicación de este programa, se han detectado algunos problemas, por ejemplo no se dispone de animales con garantías para repoblar los rebaños que son objeto de beneficio (Monleón *et al.*, 2007).

Un componente clave para el programa de erradicación, es la identificación de animales infectados a través de ensayos preclínicos con animales vivos y una matanza vigilada (Loiacono *et al.*, 2009). El diagnóstico utilizando biopsias de tejido linfoide, supone una importante herramienta en el control y erradicación de la enfermedad. Actuar en rebaños infectados o de riesgo y en zonas con elevada incidencia, utilizando conjuntamente la

técnica de diagnóstico *in vivo* mediante biopsias y el programa de selección genética podrían reducir el elevado costo económico y social, que el programa de control implica en la actualidad (Monleón *et al.*, 2007).

Para la erradicación de la EEB en Europa, se han aplicado programas de control, (legislación de la UE 999/2001), como por ejemplo la eliminación de materiales de riesgo, vigilancia activa de los bovinos, ovinos y cabras, mejoramiento genético de ovejas hacia el Scrapie y bovinos resistentes a la EEB (Langeveld *et al.*, 2006).

Contaminación ambiental y transmisión de la infección.

El Scrapie es infeccioso y contagioso. Se ha reconocido que el Scrapie se extiende a lo largo de las líneas familiares en las manadas de ovejas infectadas. Estudios tempranos, sugieren que la infección en el útero o trans-ovarica se produce en los rebaños en que figuran fallas de diseño e implementación y lo más probable, es que no hay transmisión de la infección antes del parto (O'Rourke *et al.*, 2011). Varios estudios epidemiológicos, han demostrado que las explotaciones que no disponen de incineración de placenta tiene un riesgo más alto en su rebaño. Este tejido es infeccioso y contiene la PrPsc, incluso con bastante anterioridad a que las ovejas desarrollen la enfermedad clínica (Jeffrey y González, 2007; Vascellari *et al.*, 2007). Esta información se ha utilizado para sugerir que la infección se transmite principalmente durante el período de parto (González, 2002; O'Rourke *et al.*, 2011).

A diferencia de los rebaños que paren todo el año, los partos comerciales se restringen a períodos relativamente cortos, a finales de invierno y primavera, modelos matemáticos por lo tanto, pueden ayudar a identificar éste como uno de los momentos de mayor exposición a la infección, por el contacto con la placenta. La duración de esta exposición afecta las tasas de transmisión a la descendencia. Rebaños en los cuales, los corderos de madres contagiadas se eliminan en el nacimiento, tienen una menor incidencia (10%) de Scrapie en la edad adulta, que los que son separados mas tarde (15%), o los que no son separados (41%). Además de la evidencia epidemiológica de riesgo, exposición y transmisión, IHQ y

estudios de *Western Blot* han confirmado la presencia de la PrPsc en la placenta de ovejas infectadas por Scrapie (Jeffrey y González, 2007; Vascellari *et al.*, 2007).

Si el prión está presente en la placenta o no, depende tanto del estado de la infección del hospedero, como del genotipo del feto. Solo en las placentas de los fetos genotípicamente susceptibles se acumulará PrPsc. Es probable que la transmisión horizontal entre las ovejas, durante otros periodos, contribuyan a la propagación de la enfermedad dentro y entre rebaños. Además de la placenta, se ha demostrado que existe una serie de otros tejidos que contienen la PrPsc y que potencialmente podría contribuir a la contaminación del ambiente, fuera del período de parto. La PrPsc está presente en los macrófagos de la mucosa rectal, lo que puede causar la contaminación de las heces. La acumulación de la PrPsc en el intersticio de las papilas renales, puede potencialmente resultar en que la infección llegue a la orina. Del mismo modo, la acumulación de la PrPsc en la lengua, puede llevar a la infección de la saliva. Además, en venados infectados con caquexia crónica, se ha demostrado la presencia de la PrPsc en el tejido linfoide asociado a bronquios, lo que puede dar lugar a la infección en aerosol y su presencia en los linfonódulos peri glandulares de la glándula mamaria, podría determinar la contaminación de la leche (Jeffrey y González, 2007; Vascellari *et al.*, 2007). La evidencia reciente indica que el Scrapie puede ser transmitido vía láctea desde una oveja infectada a un rebaño negativo, posiblemente por medio de macrófagos infectados (Bessen *et al.*, 2010), lo mismo se describe desde cabras infectadas (O'Rourke *et al.*, 2011).

Además de los casos de CJD genética y esporádica, la CJD y su posible transmisión iatrogénica al ser humano, pone en peligro la salud pública. Cientos de pacientes han sido infectados por esta enfermedad, durante procedimientos quirúrgicos con instrumentos contaminados, trasplantes de órganos y tejidos, terapias con hormonas, y vacunaciones. Recientemente, se han reportado algunos casos de transmisión de la CJD, a través de transfusión de sangre. Estos informes plantean otra preocupación en salud pública humana, porque se creía que la sangre era un reservorio ineficiente en transmisión de priones y por lo tanto, nunca se había sospechado de la contaminación priónica de suministros de sangre (Ryou, 2007).

La transmisión de CJD, se ha relacionado con transfusiones de sangre en Gran Bretaña, lo que indica que es una eficaz vía de transmisión. Estos hallazgos, destacan un riesgo significativo para los destinatarios de los componentes sanguíneos contaminados con vCJD, y los servicios de sangre en el Reino Unido han respondido, al poner en marcha medidas de precaución, incluida la leucodepleción (Terry *et al.*, 2009).

La PrP también está presente en la retina, donde principalmente se acumula en las capas plexiformes y en un patrón sugerente de asociación en la glándula suprarrenal. Mientras estos tejidos no son relevantes en la transmisión de Scrapie, si lo son para estudios sobre su patogénesis (Jeffrey y González, 2007).

La transmisión horizontal indirecta también es posible, teniendo en cuenta la alta resistencia del agente a la inactivación y su supervivencia en el medio ambiente. El contagio por ingestión de alimentos contaminados, de forma análoga a lo que ocurrió con la EEB bovina, es ciertamente posible. No está claro hasta qué punto vectores (p.ej. ácaros y helmintos, como se ha sugerido en alguna ocasión) o reservorios en otras especies pueden jugar un papel, mientras que la transmisión iatrogénica a través de vacunas contaminadas si está documentada (González, 2002).

En definitiva, las posibles vías de transmisión son numerosas, pero su contribución relativa no ha sido dilucidada. Ello es en gran medida debido a la concurrencia de factores ya citados, como el largo período de incubación, la dificultad de detección de animales infectados subclínicos y la influencia del genotipo en la susceptibilidad (González, 2002).

Salud y seguridad alimentaria.

Aunque los estudios no han logrado apoyar el vínculo entre las enfermedades priónicas humanas y el Scrapie, sigue habiendo una posibilidad teórica de que la EEB este enmascarada dentro de los casos de Scrapie ovino. Como tal, estos casos podrían representar riesgo para la salud humana y es necesario tener precauciones en los mataderos, para evitar que los tejidos que contienen altos niveles del prion, principalmente los del SNC, lleguen a la cadena alimentaria humana (Jeffrey y González, 2007).

La asociación entre la vCJD y la EEB representa un riesgo potencial para la salud pública y por lo tanto, se aplican con especial cuidado medidas de precaución y diagnóstico a las EETs actualmente. Es obligatorio según la normativa de la UE, la matanza de todo el rebaño, en el caso de que un animal se detecte positivo o al menos, todos los que presenten un genotipo susceptible, los efectos socio-económicos implicados, indican claramente la necesidad de un método rápido de análisis en vivo, para permitir un diagnóstico preciso de las enfermedades priónicas (Carmona *et al.*, 2005).

El resurgimiento de nuevos casos, podría estar vinculado con un aumento en la sensibilidad y la frecuencia con la que actualmente se ejecutan los procedimientos de prueba. Estos datos ponen también de manifiesto, el déficit en el conocimiento sobre la epidemiología y la transmisión del prión, así como posibles rutas de las enfermedades priónicas en los seres humanos y los animales. Esto indica que los priones de la EEB pueden estar siendo reciclados entre los seres humanos, lo que ha causado una alarma considerable, ya que la oferta de productos farmacéuticos y sanguíneos puede verse amenazada (Aguzzi *et al.*, 2008).

Con respecto a la EEB, la protección de los consumidores está garantizada esencialmente por la extracción de órganos con probabilidades de contener priones o materiales especificados de riesgo (MER: se considera el cráneo, incluido el encéfalo, los ojos, las amígdalas, la médula espinal de los bovinos de más de doce meses de edad y el intestino, del duodeno al recto, de los bovinos de cualquier edad), y la aplicación de pruebas sistemáticas a todos los bovinos de edades comprendidas entre los 24 a 30 meses, dependiendo de la categoría de la canal y el país, con esto, la epizootia ha disminuido claramente desde el año 2001 en Europa (Grassi *et al.*, 2008).

La demostración de contaminación de la sangre tiene poca relevancia en la transmisión entre las ovejas, pero en el caso de vCJD hay una clara repercusión en los problemas de la salud humana, ya que la sangre impregna todos los tejidos de las ovejas utilizadas en la alimentación. Músculos estriados tradicionalmente han sido considerados con niveles insignificantes en la infección, aunque estudios más recientes han demostrado que los

músculos, pueden contener la PrPsc en las EETs de hombres, ciervos y ovejas. Diversos métodos de laboratorio han confirmado que la PrPsc está presente en una amplia gama de músculos estriados, tanto en la forma experimental, como en la natural. Los niveles de infección en el musculo se estiman en 1/5000 veces menos que en el cerebro. Por lo tanto, aunque la EEB pueda estar presente en el ganado ovino por su bajo título, la aparición tardía y su baja concentración, el músculo no constituye un riesgo considerable para el consumo humano (Jeffrey y González, 2007).

Situación nacional.

Según indica el “Informe anual de salud animal para la notificación de la ausencia o presencia de todas las enfermedades” entregado por la OIE, en Chile no se han descrito casos de Scrapie y esta categorizada dentro de las “Enfermedades ausentes en el país o nunca señaladas” y las medidas de lucha contra el ingreso de la enfermedad es la cuarentena en las fronteras del país (OIE, 2010).

La autoridad oficial de sanidad animal para el territorio nacional; el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), es el organismo encargado de certificar esta condición y de establecer las medidas preventivas conducentes a mantenerla en el tiempo (Bravo, 2008).

Las enfermedades exóticas de rumiantes en las cuales se realiza vigilancia son Fiebre Aftosa, Lengua Azul, Estomatitis Vesicular y Scrapie. Sin embargo, la vigilancia de estas enfermedades se focaliza principalmente en áreas limítrofes correspondientes a todas las regiones (SAG, 2010).

El sistema de vigilancia epidemiológica pasiva de la sanidad animal del país, está conformado por la recepción y atención de las denuncias de posibles patologías que pudiesen afectar a los animales. Este es un sistema de recolección de información, de gran utilidad para el SAG de vital importancia la vigilancia epidemiológica de las enfermedades de la población animal del país (SAG, 2006). La vigilancia para Scrapie, se realiza en ovinos faenados en matadero de las regiones de Aysén y Magallanes donde se realiza la

mayor faena ovina del país, además de predios ovinos de todo el país y campos de pastoreo cordilleranos desde Coquimbo hasta la Araucanía (SAG, 2010).

Con respecto al ganado bovino, el Programa de Vigilancia Intensiva de EEB comenzó en Chile el año 2005, basado en las normas técnicas emanadas de la OIE, que definen no sólo las subpoblaciones animales de riesgo susceptibles de ser analizadas, sino, además, establecen el esquema que deben cumplir los países, zonas o compartimentos que aspiran a alcanzar una condición de país con riesgo insignificante o controlado, así como el puntaje de vigilancia a alcanzar, dependiendo de la situación zoonosanitaria de cada país y de la subpoblación animal muestreada (SAG, 2006).

La aparición del primer caso nativo de EEB en Canadá, en mayo del 2003 y posteriormente en Estados Unidos; países desde donde Chile importó harina de carne y hueso (HCH), desencadenó una serie de nuevos eventos en el programa de prevención de la EEB del SAG. Así se incrementó la fiscalización de las fábricas de alimentos elaboradoras de insumos, destinadas a la alimentación animal, se prohibió la alimentación con proteína mamífera a rumiantes y se realizó el rastreo e identificación de los planteles que utilizaron las HCH importadas desde Canadá y Estados Unidos (Bravo, 2008).

Un componente de esta vigilancia sanitaria, se enmarca bajo el concepto de vigilancia activa y obedece a la actividad de toma de muestra en diferentes especies animales con el objetivo de verificar, por ejemplo, la ausencia de una determinada enfermedad exótica para el país (SAG, 2010).

En mayo de 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).

Basados en los antecedentes descritos, para esta memoria de título se propusieron los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL.

Contribuir al diagnóstico de Scrapie mediante la Inmunohistoquímica en tejido linfoide de muestras de tercer párpado ovino obtenidas *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Obtener muestras de tercer párpado en ovinos *in vivo* y evaluar la aptitud de las muestras mediante la tinción Hematoxilina-Eosina y la observación de los centros germinales.

Estandarizar la técnica de Inmunohistoquímica en tejido linfoide de tercer párpado ovino, como método *ante-mortem*.

MATERIAL Y METODO.

El desarrollo práctico de esta memoria de título fue realizado tanto en el Departamento de Patología de la Facultad de Cs. Pecuarias y Veterinarias de la Universidad de Chile, como en la unidad de Patología Animal del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria, perteneciente al Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG), ubicado en Lo Aguirre

Obtención de muestras de tercer párpado ovino.

Las muestras fueron obtenidas de 50 ovinos mayores de 2 años de edad en distintos predios de la zona rural de la Región Metropolitana, previo a la faena o venta. Los animales fueron puestos en una manga de selección, inmovilizados por medios mecánicos (sujeción), ordenados de manera tal que la cabeza quedó inmóvil pero accesible para la manipulación. Se aplicó lidocaína al 2% en forma tópica sobre la conjuntiva ocular, 10 min previo a la toma de muestra, en ambos ojos. Se exteriorizó el tercer párpado de cada ojo del animal, con una pinza hemostática para mantener expuesto el tejido, como se muestra en la figura, el que fue retirado con ayuda de tijeras curvas. El tejido linfoide se visualiza cercano al ángulo medio de la superficie bulbar del tercer párpado.



Figura 3: Muestra la exposición del tercer párpado y ubicación del tejido linfoide (Bender *et al.*, 2004).

El tejido obtenido fue puesto en *cassettes* histológicos, que fueron identificados según el protocolo correspondiente y el año de la toma de muestra. Los *cassettes* fueron depositados en frascos identificados que contenían formalina tamponada al 10%, para ser transportados a las dependencias del SAG, donde se llevo a cabo el procesamiento.

Procesamiento e inclusión en parafina.

Los tejidos fueron mantenidos en formalina al menos por 48 hrs previo a su procesamiento, el cual fue realizado en un procesador automático de tejidos (Leica TP1020). Así las muestras fueron sometidas a concentraciones crecientes de alcohol, xilol y finalmente parafina, como se describe en el anexo 1.

Preparación de los cortes.

Inclusión de las muestras: previo al corte, los tejidos fueron incluidos en parafina. Para esto se utilizó un centro de inclusión de tejidos (Leica EG1160).

Corte de las muestras: los tejidos ya incluidos se cortaron de un grosor de 4-5 μm , en un micrótopo (Leica RM2145). De cada muestra se obtuvieron cortes seriados, para realizar tanto la tinción H-E como la técnica de IHQ. Uno de los cortes fue puesto en un portaobjeto cubierto con una capa de albúmina como medio adherente para H-E y el otro, para IHQ, fue depositado en un portaobjeto con carga eléctrica (ProbeOn Plus FisherBiotech), para mejorar la adherencia del tejido.

Adherencia y secado: el primero de los cortes de cada una de las muestras, se distribuyeron en un canastillo y fueron sometidos a calor en una estufa (Thelco 31608) a 60°C durante 30 min, para finalmente ser mantenidos a 37°C durante toda la noche en una estufa de secado (Elconap B-1-P).

Hematoxilina-Eosina.

Hidratación: los tejidos fueron sometidos a baños de xilol y alcoholes en graduación decreciente y a continuación a la tinción corriente con H-E (Anexo 2). Luego, sobre la muestras se colocó un cubreobjeto con un adherente y se observó al microscopio para su clasificación.

La clasificación como apta o no apta, dependió del número de centros germinales observados. Así, para designar una muestra como apta se debía observar a lo menos 4 centros germinales después de realizar la tinción de H-E, puesto que 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 la reacción de inmunotinción (O'Rourke *et al.*, 2002). Las muestras que no cumplían con este requisito se clasificaron como no aptas y se repitieron.

Inmunohistoquímica.

Para realizar esta técnica, se utilizó el corte homólogo de la muestra clasificada como apta por H-E. Los portaobjetos fueron secados sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua bajo el tejido, de esta forma no se utilizó el secador de portaobjetos, para evitar el desprendimiento de la muestra (Bravo, 2008).

Posteriormente los portaobjetos fueron sometidos a calor en una estufa (Thelco 31608) a 60°C durante 1 h y luego a 37°C durante toda la noche en una estufa de secado (Labtech LDO-100E). A continuación, fueron sometidos a baños de xilol y alcohol en graduación decreciente, para su posterior hidratación (Anexo 3).

Bloqueo peroxidasa endógena: este proceso se utiliza para inhibir la actividad endógena de la enzima peroxidasa, presente en el tejido antes de la inmunotinción; de lo contrario, la enzima endógena reaccionará con el sustrato empleado, dando lugar a falsos positivos. Para esto, se utilizó una solución de agua oxigenada al 3% en metanol absoluto, en la que los cortes se mantuvieron durante 10 min. Posteriormente, las muestras fueron sumergidas 10 veces en agua desionizada o bidestilada.

Activación del antígeno: los tejidos fueron incubados en ácido fórmico al 98% durante 5 min a temperatura ambiente. Para su descontaminación, se mantuvieron en Tris HCl 1M pH 7,6; hasta que alcanzaron un pH entre 7 y 8, luego las muestras se depositaron durante 20 min en un contenedor con solución *Target Retrieval* pH 6,1 y en éste puestas a 120°C, para luego dejarlas enfriar a temperatura ambiente. Finalmente fueron incubadas en TBST (tampón salino Tris HCL *Tween* 20, a pH 7,6) durante 10 min.

Inmunohistoquímica Se realizó de acuerdo al protocolo (Farías *et al.*, 2009) y utilizando el *kit* Pullman Monoclonal (F99/97.6.1):

Las muestras fueron puestas en un sostenedor *Slide Holder* (FisherBiotech®), en el cual los portaobjetos quedan en forma pareada, lo que permite que los reactivos y lavados siguientes lleguen al tejido por capilaridad, desde el pocillo dosificador (Isolon) que contiene los reactivos. Los diferentes pasos del protocolo se indican a continuación:

- **Proteinasa K:** 150 μ L de proteinasa K fueron depositados en cada pocillo, incubando las muestras por 90 seg a temperatura ambiente, luego se realizaron tres lavados con TBST por 20 seg cada uno.
- **Anticuerpo monoclonal:** se depositaron 150 μ L del anticuerpo monoclonal F99/97.6.1 (diluido 1:1000) según indica el *kit*. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a 37°C. Seguido de tres lavados con TBST por 20 seg cada uno.
- **Anticuerpo secundario policlonal biotinilado:** en cada pocillo dosificador se agregaron 150 μ L del anticuerpo anti Mouse IgG Biotin. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente para posteriormente ser lavado con TBST tres veces por 20 seg cada una.
- **Streptavidina:** en cada pocillo se depositó 150 μ L de Streptavidina conjugada con HRP peroxidasa (Horseradish Peroxidase), las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente para luego ser lavadas con TBST durante 20 seg por 3 veces.
- **Revelado de la reacción con cromógeno:** a través de la cual se pone de manifiesto el lugar de la reacción antígeno-anticuerpo, por la adición del sustrato de la enzima y el cromógeno, en este caso se usó AEC (3-amino-9-etilcarbazol). Se depositó 150 μ L en cada pocillo y las muestras fueron incubadas durante 10 min en la oscuridad. Este proceso se llevó a cabo 2 veces, por lo que el tiempo de incubación total fueron 20 min.

- Lavados: las muestras fueron sometidas a lavados con agua destilada 2 veces por 20 seg hasta que quedaron libres del cromógeno utilizado, para facilitar la tinción posterior.
- Tinción de contraste: en la tinción final se utilizó Hematoxilina Lillie Mayer. Los tejidos fueron incubados con este colorante durante 10 min, luego de los cuales, las muestras se retiraron del sostenedor *Slide Holder* y se depositaron en un canastillo para ser lavadas con agua corriente, medio en el que se mantuvieron hasta su montaje, con un medio acuoso (Faramount).

Análisis de las muestras.

Los resultados de las muestras estudiadas, fueron comparados con controles ciegos de tejido nervioso y tejido linfoide, tanto positivos como negativos. La totalidad de estas muestras fueron aportadas por un centro de referencia canadiense (National Reference Laboratory for Scrapie and CWD, Animal Research Institute y Canadian Food Inspection Agency).

La reacción positiva del tejido linfoide de tercer párpado se identifica por una fuerte inmunotinción particulada (puntillado rojo) citoplasmática, en los centros germinales de los folículos linfoides. Como se describió anteriormente, la muestra debe contener al menos 4 centros germinales para ser considerada apta para la inmunotinción. Así una muestra se describió como:

Positiva: si al menos en uno de los 4 centros germinales se observa la inmunotinción descrita anteriormente.

Negativa: si en los 4 centros germinales no se observa inmunotinción.

Insuficiente: la que no cumplía con el requerimiento en número de centros germinales.

RESULTADOS.

Las muestras de tercer párpado obtenidas para este estudio se analizaron mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina (H-E), permitiendo así su clasificación en muestras aptas o no aptas, continuando con el protocolo de inmunohistoquímica (IHQ) sólo aquellas designadas como aptas, en las cuales es posible realizar el diagnóstico.

La clasificación de las muestras en aptas y no aptas se realizó utilizando la observación microscópica de los tejidos con H-E, basado en la presencia de al menos 4 centros germinales en el tejido linfoide del tercer párpado. Clasificándose como apta las que presenta 4 centros germinales (Figura 4) y como no apta la que se observa una menor cantidad o no los presenta. Esto porque para poder determinar que una muestra es negativa a Scrapie mediante IHQ, es necesario que contenga al menos 4 centros germinales y ninguno de ellos presente la inmunotinción.

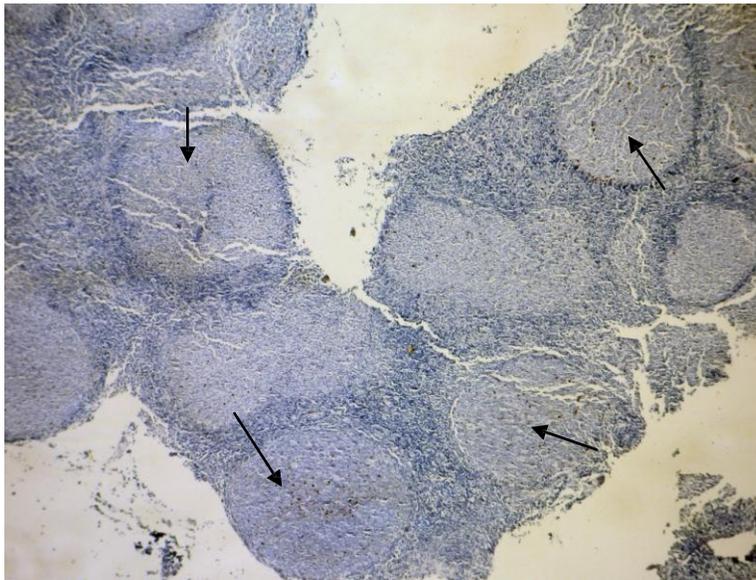


Figura 4: Microfotografía de un corte de tercer párpado considerado apto por H-E (40x). Se observa el tejido linfoide y la presencia de áreas circulares con centro pálido, correspondiente a los centros germinales (flechas).

Se estudiaron un total de 75 ovejas, obteniéndose 2 muestras de tejido linfoide de tercer párpado por animal, con 150 muestras totales. Se realizó un primer análisis con una de las muestras de cada animal muestreado y sólo en aquellos animales que resultaron no aptos, en esta primera muestra, es decir, que los cortes contenían menos de los centros germinales necesarios, se utilizó la contramuestra.

Así, en algunos animales (33) no fue necesario utilizar la segunda muestra para realizar el diagnóstico, por lo que la contramuestra se categorizó como no determinada (Tabla 5).

Tabla 5: Resumen de muestras obtenidas, indica la cantidad de muestras aptas, no aptas y no determinadas luego de la tinción H-E.

N° centros germinales	No aptas				Aptas		No determinado	Total
	0	1	2	3	4	>4		
N° muestras	43	12	6	6	11	39	33	150
Total	67				50		33	150

Una vez procesada la contramuestra en aquellas ovejas que fue necesario, se realizó el mismo proceso de tinción y análisis, obteniendo un total de 50 muestras aptas de igual número de animales (50) y 67 muestras no aptas, 50 de las cuales corresponden a las ovejas (25) en que ninguna de las dos muestras obtenidas del animal, presentó la cantidad suficiente de centros germinales para realizar el inmunodiagnóstico de Scrapie, en 43 muestras no fue posible observar la presencia de centros germinales (Tabla 5).

En este estudio de un total de 75 ovejas (100%) fue posible evaluar 50 animales (66,6%) y 25 ovejas (33,3%) no se pudieron analizar, ya que las dos muestras fueron no aptas

El método de IHQ se llevo a cabo en las 50 muestras de estudio clasificadas como aptas. Además de un total de 15 muestras controles correspondiendo 7 a tejido nervioso (óbex) y 8 a tejido linfoide. Los ensayos se realizaron en dos oportunidades, en la primera se procesaron 34 de las 50 muestras aptas, además de los controles, 2 de tejido nervioso y 4 de

tejido linfoide, distribuidas en dos manoplas, cada una contaba con 17 cortes de tercer párpado en estudio, mas los controles, 1 de óbex y 2 de tejido linfoide.

En el procesamiento de IHQ es posible que algunos de los cortes se desprendan debido a los distintos reactivos y pasos al que son sometidas las muestras como el de recuperación antigénica. Lo cual ocurrió con 11 muestras del primer grupo seleccionado. Este desprendimiento de tejido no permite evaluar las características de IHQ, por lo que estas últimas debieron repetirse.

En el segundo protocolo se procesaron 27 muestras en estudio, que corresponden a las 11 iniciales que se desprendieron y las 16 muestras aptas restantes. También se ocuparon 2 manoplas, con 13 y 14 muestras respectivamente y los controles 5 de tejido nervioso y 4 de tejido linfoide de tercer párpado.

En esta ocasión se desprendieron nuevamente tres cortes, las que por no cumplir con el mínimo de centros germinales requeridos, se clasificaron como muestras con tejido linfoide insuficiente para la determinación de la PrPsc y por lo tanto no aptas para el diagnóstico.

En la tabla 6 se muestra el resumen de todo el proceso experimental realizado con las muestras obtenidas para este estudio.

Tabla 6: Resumen de muestras analizadas indica la cantidad de aptas y desprendidas luego de IHQ.

Muestra	Cantidad (N°)	Desprendida	Total aptas
3er párpado	50	3	47
Control óbex	7	0	7
Control 3er párpado	8	0	8
Total	65	3	62

En las siguientes figuras (5, 6 y 7) se presentan las observaciones microscópicas mas representativas de los resultados obtenidos con el método de la IHQ.

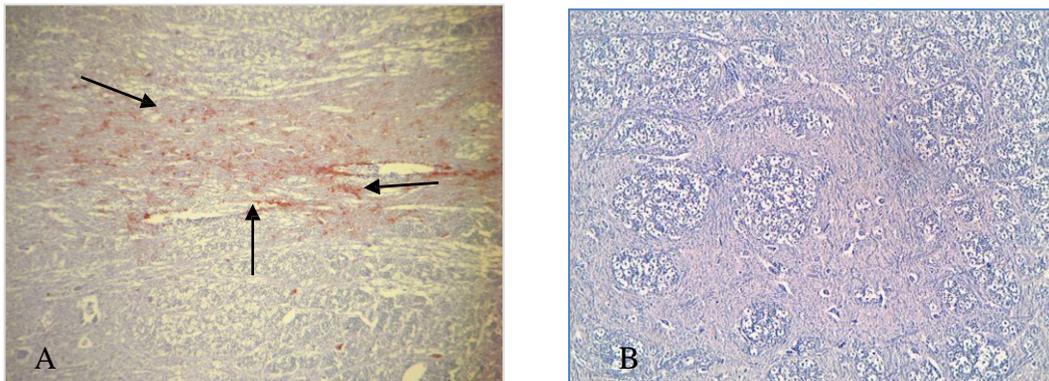


Figura 5: Microfotografías de cortes histológicos de óbex ovino. **A:** Control positivo. Las flechas indican la presencia del precipitado granular rojo, correspondiente a la inmunotinción de la proteína priónica patológica (IHQ 100X). **B:** Control negativo, en el cual no se observa el precipitado granular, lo que corresponde a ausencia de proteína priónica en el tejido (IHQ 100X).

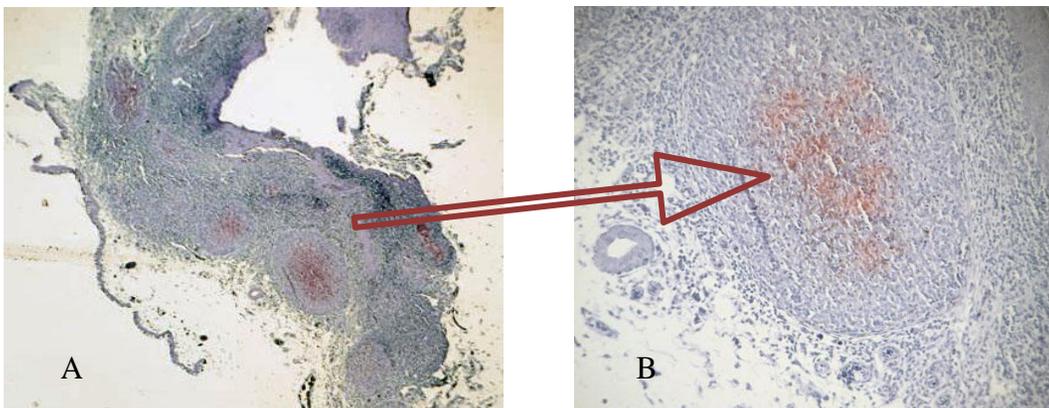


Figura 6: Microfotografías de un control positivo de tejido linfoide de tercer párpado. **A:** muestra el tejido donde se observa el precipitado correspondiente a la proteína priónica (IHQ 40X). **B:** En un aumento mayor. Se visualiza la inmunotinción por el precipitado rojo que produce la PrPsc (IHQ 100X).

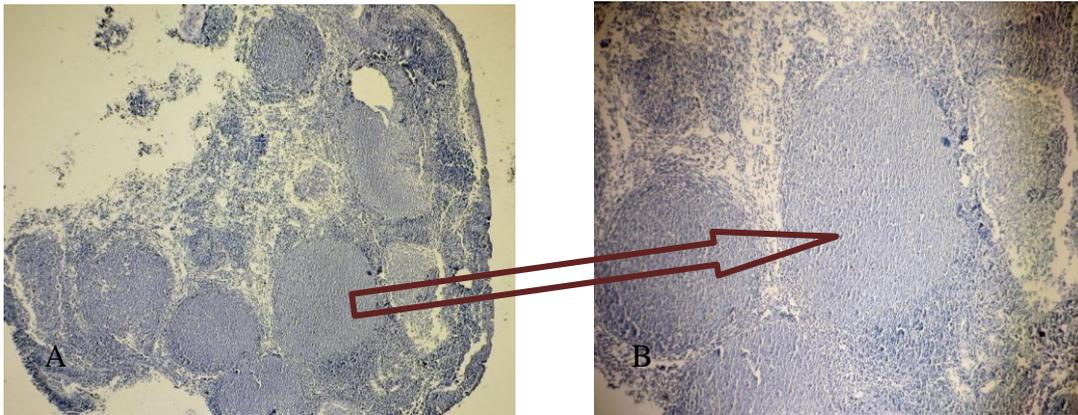


Figura 7: Microfotografías de un corte de tejido linfoide en estudio categorizada como apta. **A:** Se observa la presencia de mas de los 4 centros germinales requeridos (IHQ 40X). **B:** Con un mayor aumento, se puede apreciar la integridad del tejido sin precipitado rojo lo que indica que la muestra es negativa (IHQ 100X).

El correcto desarrollo de la técnica de IHQ realizada, queda demostrada a través de los controles utilizados en cada uno de los ensayos, puesto que los controles negativos no presentaron inmunoreacción, mientras que en los positivos de óbex y tejido linfoide siempre se observó el precipitado correspondiente a la inmunotinción característica de la reacción positiva en IHQ.

En la tabla 7, se resumen los resultados obtenidos mediante la IHQ de la totalidad de las muestras, incluyendo los controles positivos y negativos aportados por el laboratorio de referencia canadiense.

Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos al analizar el tejido linfoide del tercer párpado de ovinos mediante la técnica IHQ.

Muestras	IHQ	Positivas	Negativas
3er párpado	47	0	47
Control óbex	7	4	3
Control 3er párpado	8	8	0
Total	62	12	50

Por lo que, de acuerdo a los protocolos recomendados y utilizados en esta memoria, las 47 muestras obtenidas de ovejas de la Región Metropolitana que corresponden finalmente a la totalidad de las muestras aptas, fueron diagnosticadas como negativas a la presencia de proteína priónica patógena (PrPsc), ya que en ninguna de ellas en los 4 o más centros germinales observados, se visualizó el precipitado de la inmunoreacción positiva.

DISCUSION.

En el pasado la confirmación de Scrapie, enfermedad que afecta a ovejas y cabras, se hacía por el examen del tejido cerebral y sus respectivos cambios histopatológicos más destacados, que incluyen vacuolización limitada de la materia gris y pérdida de neuronas acompañada de gliosis (Jeffrey y González, 2007; Loiacono *et al.*, 2009).

Sin embargo, más recientemente el diagnóstico histopatológico fue reemplazado en gran medida por el inmunohistoquímico, más sensible y confirmatorio en la detección de la PrPsc en el cerebro y los tejidos linfoides (TL) (Loiacono *et al.*, 2009). Es una prueba que permite detectar la presencia de la PrPsc en el tejido y que al aplicarse en el TL de animales que aun no presentan signología clínica, nos entrega herramientas útiles para el manejo de los animales vivos.

Basado en la patogenia del Scrapie, que luego de ingresar por vía oral, llega al TL gastrointestinal, donde se amplifica y disemina primero hacia otros órganos linfáticos para luego pasar al tejido nervioso periférico y finalmente al sistema nervioso central (SNC), a diferencia de la EEB, la detección de la PrPsc en tejidos linfoides permite diagnosticar la enfermedad antes de que el prión se propague al sistema nervioso (Monleón *et al.*, 2007).

En los diferentes tejidos linfoides, el número de folículos varía con la edad, en las biopsias de mucosa rectal, estos disminuyen con la edad, los animales jóvenes entre 1 y 2 años, presentan un mayor número de folículos que los de mayor edad. En cambio, la biopsia de tercer párpado revela una cantidad similar de folículos linfoides en los animales entre 1 y 6 años de edad (Monleón *et al.*, 2011), por este motivo en el presente estudio se consideraron animales mayores de 2 años, para quedar dentro de este rango etario, en los cuales además es posible detectar la enfermedad clínica, lo que permitió incluir dentro del muestreo a los animales con mayor riesgo. Así la involución normal de los folículos linfoides relacionada con la edad del animal, es insignificante en ovejas afectadas por Scrapie, lo que sugiere que los efectos fisiológicos en el desarrollo del tejido linfoide, se ven disminuidos debido a la acumulación de la PrPsc (Jeffrey y González, 2007). Si bien en las muestras evaluadas en nuestro estudio, no se observó la presencia de proteína priónica patológica que pudiera

alterar este proceso, la involución del tejido no fue una característica evaluable, ya que los animales muestreados pertenecían a un rango etario de entre 2 y 5 años, edad donde la involución fisiológica aun no se presenta.

El diagnóstico de Scrapie en las ovejas mediante la biopsia y análisis de la PrPsc en tejido linfoide de tercer párpado, según lo descrito por distintos autores (O'Rourke *et al.*, 2000; Jeffrey y González 2007; Monleón *et al.*, 2011), es una prueba práctica para animales vivos y es útil como diagnóstico preclínico de Scrapie en los programas de vigilancia. Aunque el tejido linfoide de tercer párpado es accesible y basta con anestésiar localmente, un obstáculo en la utilización de esta prueba es la obtención de muestras con un número suficiente de folículos linfoides, debido a la distribución irregular del TL en el tercer párpado y la escasa cantidad de folículos linfoides presentes en muestras de las ovejas de más edad (mayor a 7 años), como lo indica Bender *et al.* (2004). Para nuestro estudio el factor “edad” no fue influyente, ya que el grupo muestral no superó ese rango etario, pero si se afectó por la distribución irregular del TL. Este fue un inconveniente para poder desarrollar esta memoria, puesto que en un 33,3% de 75 ovejas no se encontró tejido linfoide suficiente. Mientras que O'Rourke *et al.* (2000), obtuvieron un 20% de muestras con tejido linfoide insuficiente y dos años después, O'Rourke *et al.* (2002), en un total de 690 muestras repitieron el porcentaje de no aptas, ambos estudios se realizaron en animales vivos. La tasa de éxito en la obtención de muestras de estos estudios, se puede explicar porque su selección se basó en animales de genotipo susceptible, con vigilancia activa y ovejas que tuvieron contacto con animales infectados con vigilancia pasiva.

En Chile, el estudio realizado en muestras de tercer párpado por Bravo (2008), presenta un 61% de animales aptos, el cual fue realizado en ovinos *post mortem*, lo que no lo hace muy comparable a nuestro porcentaje por las variables de campo que se pueden manejar. Sin embargo, Bravo consideró solo una muestra por animal, mientras nuestro estudio consideró dos, explicando el 66,6 % de animales aptos para nuestra evaluación. Estos resultados indican que tomar dos muestras por animal aumenta el porcentaje de éxito, lo cual es ratificado en Monleón *et al.* (2011), quienes indican que existe un aumento en el éxito de la biopsia al tomar dos muestras por ovino.

Un análisis de los datos del estudio realizado por Bender *et al.* (2004), indican que la tasa de éxito para la obtención de biopsia del tercer párpado con suficientes folículos linfoides para el diagnóstico, mejora en aproximadamente en un 70% a 90% con el uso de gotas oftálmicas de histamina/proparacaína. Así de un 30% de muestras con tejido insuficiente al usar solo proparacaína, pasó a un 9.9% cuando se adicionó además histamina a la solución. En nuestro estudio, en que previo al proceso de extracción del tejido linfoide de los animales se instiló proparacaína en gotas oftálmicas en ambos ojos, facilitó el manejo, lo que ratifica lo descrito por O'Rourke *et al.* (2002), donde se menciona que la biopsia de tercer párpado de animales vivos, es más exitosa si se realiza en animales que han recibido un anestésico tópico, sin embargo, por razones de disponibilidad no se utilizó histamina en esta solución, lo que podría haber aumentado nuestro número de ovejas aptas para IHQ, que finalmente fueron 50, lo que corresponde a un 66,6% de los animales.

En relación tanto a la sensibilidad, que corresponde a la proporción de animales infectados, que tuvieron resultados positivos, como a la especificidad que es la proporción de animales no infectados que obtuvieron resultados negativos en la prueba, según Monleón *et al.* (2007), la especificidad de esta técnica de diagnóstico para el Scrapie, a través de la detección de la PrPsc utilizando tejido obtenido por biopsia, tanto de tercer párpado como de mucosa rectal, es de un 100% respecto a las técnicas de confirmación *post mortem* reconocidas por la OIE. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica fue menor, siendo del 72% cuando se utilizó la biopsia de tercer párpado (Monleón *et al.*, 2007). En nuestro estudio los 8 cortes utilizados como controles positivos de tejido linfoide de tercer párpado, presentaron la inmunotinción, correspondiendo al 100%, lo mismo ocurrió con los controles de tejido nervioso. Mientras que, los controles negativos y las muestras nacionales estudiadas no presentaron el precipitado característico. Aún así, la existencia de falsos negativos se pueden deber a diferentes causas, como la ausencia o poca presencia de la PrPsc en el TL de animales infectados, la distribución no homogénea de la proteína patológica en el TL o al tamaño inadecuado de la muestra (con escasos folículos linfoides) (Monleón *et al.*, 2007). La diferencia en los porcentajes con respecto a la bibliografía se podría explicar por la selección que realizamos previo a la IHQ, mediante la tinción H-E, donde evaluamos primero la aptitud de la muestra, por lo que todas la muestras utilizadas y

analizadas en este estudio por el inmunoensayo tenían al menos 4 centros germinales comprobados, lo que disminuye el error por número inadecuado de folículos en las muestras.

Monleón y colaboradores (2011), en su estudio de comparación entre TL obtenido de tercer párpado y de la mucosa rectal, obtuvieron un número mayor de muestras aptas cuando se utilizó la biopsia de tercer párpado, e indica que estas muestras dieron mejores resultados, su recolección presenta mayor dificultad dada por la inmovilización del animal y por ende, se debe invertir más tiempo en su realización. Esto queda de manifiesto en nuestro estudio, ya que mientras la sujeción fue realizada por personal inexperto, la toma de la muestra fue más engorrosa y el número de folículos linfoides fue siempre menor, lo cual cambió con la ayuda de personal especializado, en que el desarrollo fue más rápido y con mejores resultados, lo que se ve reflejado en el total de ovejas muestreadas (75) en relación a los 50 animales que fue posible evaluar. Además, el proceso realizado es sencillo, no tiene efectos adversos en el animal y no interviene en el comportamiento normal del ovino.

Por otra parte, el proceso en sí de la IHQ es agresivo para los tejidos, los cuales se pueden desprender del portaobjeto, lo que nos lleva a perder la muestra o que se reduzcan a un tamaño de muestra insuficiente, en las cuales no se puede determinar la presencia de la proteína priónica. En este estudio, para minimizar el desprendimiento de las muestras se utilizó la modificación al protocolo de secado realizado en Bravo (2008), sin embargo y a pesar de esto, se desprendieron 3 muestras, que pese a ser consideradas aptas mediante H-E, no pudieron ser evaluadas por IHQ, siendo categorizadas como muestras con tejido insuficiente, lo que podría atribuirse a una condición propia del tejido, más que al proceso de secado. Determinando que solo el 62.6% de las ovejas fueran diagnosticadas correctamente por IHQ, que corresponde al 94% de las muestras clasificadas como aptas mediante H-E.

La importancia del genotipo en la patogenia del Scrapie, es otro punto importante, ya que, así como entre las especies bovina y ovina hay diferencias en cuanto a la presencia de la PrPsc en el TL, dentro de las mismas ovejas existen diferencias marcadas por el genotipo

del hospedero (Jeffrey y González, 2007; Monleón *et al.*, 2011). Así, según lo descrito, la PrPsc se puede detectar tanto en el tejido linfoide, como en el sistema nervioso central en ovinos que presentan el genotipo más susceptible al Scrapie clásico VRQ/VRQ, mientras que en los animales VRQ/ARR y en menor medida ovejas VRQ/ARQ, que son afectadas naturalmente, no existe evidencia de infección o acumulación de la PrPsc en tejidos linforeticulares (Davies *et al.*, 2004; Ortiz-Peláez y Bianchini, 2011).

Hasta ahora no existe información de genotipado de ovejas en el país, lo cual podría haber interferido en el análisis de las muestras o hacerlo en un futuro muestreo masivo, ya que podríamos estar en presencia tanto de resistencia genética, como de escasa o nula participación del TL en la patogenia, características relacionadas directamente con el genotipo del ovino. Esto plantea una necesidad importante, si se quiere tener información clara y completa sobre el estado de la masa ovina nacional con respecto al Scrapie, ya que no solo es necesario tomar muestras de tejido linfoide periférico de tercer párpado para un *screening*, si no que sería más útil complementar este estudio con un análisis de los genotipos predominantes en el país, para fomentar y explotar principalmente aquellos que muestran resistencia a la enfermedad.

De esta forma, se han descrito cepas de priones de Scrapie que no presentan diseminación a TL, como lo es la Nor98 (Loiacono *et al.*, 2009), lo que deja un área sin investigar, ya que al no existir un estudio acabado de esta enfermedad en Chile, no se puede descartar la presencia de esta u otra variante. Además los anticuerpos disponibles y precisamente utilizados en esta memoria están orientados al Scrapie clásico, no a la Nor98, abriendo paso a la utilización de nuevos anticuerpos y/o mezcla de ellos, para realizar un estudio más amplio en el análisis de la masa ovina nacional.

Las vías de contagio masivas y no muy estudiadas a la fecha, son un punto en el cual también se debería poner atención, como por ejemplo la colonización del epitelio nasal, que ocurre en varias especies y con diferentes cepas de priones y como en muchos otros paradigmas experimentales, el tejido linforeticular es el primer sitio de depósito de la PrPsc (Haybaeck *et al.*, 2011). Otra de estas vías que es muy importante en el Scrapie es el

momento del parto, si bien la contaminación del medio ambiente a través de la placenta y tejidos del parto son una fuente probable de transmisión, la contaminación de la lana de la madre, las ubres e inclusive la leche, pueden representar un riesgo para el cordero recién nacido en la búsqueda temprana del calostro (O'Rourke *et al.*, 2011).

El análisis del TL, mediante IHQ realizado en animales de distintas zonas de la Región Metropolitana, aplicado en forma preclínica para Scrapie es sin duda un avance en el diagnóstico de esta enfermedad, ya que en el país es poco lo realizado al respecto y además en animales muertos o faenados, bajo la vigilancia pasiva que realiza el SAG para esta enfermedad (SAG, 2010). En cambio, este estudio entrega un método preclínico, con datos importantes para ser analizados y una propuesta de trabajo aplicable a la vigilancia y control del Scrapie a nivel nacional.

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

CONCLUSION.

Mediante la tinción de hematoxilina eosina (H-E) y basados en la cantidad de centros germinales fue posible determinar la aptitud de la muestra de tejido linfoide para ser evaluada por la técnica de IHQ, en el diagnóstico de Scrapie.

La totalidad de las muestras nacionales recolectadas, así como los controles negativos de tejido nervioso y de tejido linfoide en que se realizó el método de IHQ, no presentaron la inmunoreacción positiva correspondiente a la presencia de la PrPsc, deposito granular que si fue observado en las muestras de control positivo.

La técnica IHQ realizada en el tejido linfoide del tercer párpado de ovinos *in vivo* es un método practico, fácil de llevar a cabo y con un mínimo malestar para el animal, que hace posible su utilización como método de *screening* en animales vivos.

El diagnóstico por IHQ en biopsias de tejido linfoide, puede convertirse en una importante herramienta en el establecimiento de programas de vigilancia para el monitoreo y prevención de Scrapie a nivel nacional.

Se logró implementar y validar la técnica de IHQ para la detección del Scrapie, en muestras de tercer párpado ovino *in vivo* en las condiciones de laboratorio país.

REFERENCIAS.

1. **Aguzzi, A.; Heppner, F.; Heikenwalder, M.; Prinz, M.; Mertz, K.; Seeger, H.; Glatzel, M. 2003.** Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS. *British Med. Bull.* 66: 141-159.
2. **Aguzzi, A.; Sigurdson, C.; Heikenwaelder, M. 2008.** Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3: 11-40.
3. **Bender, S.; Alverson, J.; Herrmann, M.; O'Rourke, I. 2004.** Histamine as an aid to biopsy of third eyelid lymphoid tissue in sheep. *Vet. Rec.* 154: 662-666.
4. **Benestad, S.; Arsac, J.; Goldmann, W.; Nöremark, M. 2008.** Atypical/ Nor98 Scrapie: properties of the agent, genetics and epidemiology. *Vet. Res.* 39(4): 191-205.
5. **Bessen, R.; Shearin, H.; Martinka, S.; Boharski, R.; Lowe, D.; Wilham, J.; Caughey, B.; Wiley, J. 2010.** Prion Shedding from Olfactory Neurons into Nasal Secretions. [en línea]. *J. PLoS Pathog.* 6(4). <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855443/>> [consulta: 24-11-2011] 14 pp.
6. **Bravo, C. 2008.** Diagnóstico de Scrapie por inmunohistoquímica en tejido linfoide del tercer párpado en ovinos. Memoria de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 99 pp.
7. **Carmona, P.; Monzón, M.; Monleón, E.; Badiola, J.; Monreal, J. 2005.** *In vivo* detection of Scrapie cases from blood by infrared spectroscopy. *J. Gen. Virol.* 86: 3425-3431.
8. **CRL. European Community Reference Laboratory for Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) 2007.** Clinical signs of transmissible

spongiform encephalopathies in sheep. [en línea]. <http://www.defra.gov.uk/vla/science/docs/sci_goat_res.pdf> [consulta: 13-11-11] 11 pp.

9. **Davies, M.; Hopkins, L.; Halliday, S.; Houston, F.; Hunter, N.; McConnell, I. 2004.** Architecture of secondary lymphoid tissue in sheep experimentally challenged with Scrapie. *Immunology*. 111: 230-236.
10. **Dudas, S.; Yang, J.; Graham, C.; Czub, M.; McAllister, T. 2010.** Molecular, Biochemical and Genetic Characteristics of BSE in Canada. [en línea]. *PLoS ONE* 5(5). <www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871047/?tool=pubmed> [consulta: 24-11-2011] 8 pp.
11. **Ersdal, C.; Ulvund, M.; Benestad, S.; Tranulis, M. 2003.** Accumulation of Pathogenic Prion Protein (PrP^{Sc}) in Nervous and Lymphoid Tissues of Sheep with Subclinical Scrapie. *Vet. Pathol.* 40: 164-174.
12. **Farías, G.; Machuca, A.; Bravo, C.; Madariaga, M.; Jara, C.; Lecocq, C. 2009.** Utilización de inmunoreacciones para la detección de Scrapie en obéx ovinos provenientes de la XII Región de Chile. *Av. Cs. Vet.* 24(1 y 2): 49-55.
13. **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. 79 -91.
14. **González, L.; Dagleish, M.P.; Martin, S.; Dexter, G.; Steele, P.; Finlayson, J.; Jeffrey, M. 2008.** Diagnosis of preclinical Scrapie in live sheep by the Immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet. Rec.* 162: 397-403.
15. **Grassi, J.; Maillet, S.; Simon, S.; Morel, N. 2008.** Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet. Res.* 39(4): 33-45.

16. **Gubbins, S.; Touzeau, S.; Hagenaars, T. 2010.** The role of mathematical modelling in understanding the epidemiology and control of sheep transmissible spongiform encephalopathies: a review. *Vet. Res.* 41(4): 42-65.
17. **Haybaeck, J.; Heikenwalder, M.; Klevenz, B.; Schwarz, P.; Margalith, I.; Bridel, C.; Mertz, K.; Zirdum, E.; Petsch, B.; Fuchs, T.; Stitz, L.; Aguzzi, A. 2011.** Aerosols Transmit Prions to Immunocompetent and Immunodeficient Mice. [en línea]. *PLoS Pathog.* 7(1). <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2030930/?tool/pubmed>> [consulta: 24-11-2011] 19 pp.
18. **Jeffrey, M.; González, L. 2007.** Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33: 373-394.
19. **Konold, T.; Davis, A.; Bone, G.; Bracegirdle, J.; Everitt, S.; Chaplin, M.; Saunders, G.; Cawthraw, S.; Simmons, M. 2007.** Clinical findings in two cases of atypical Scrapie in sheep. [en línea]. *BMC Vet. Res.* 3:2. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1810526/?tool=pubmed>> [consulta: 24-11-2011] 16 pp.
20. **Kratzel, C.; Krüger, D.; Beekes, M. 2007.** Relevance of the regional lymph node in Scrapie pathogenesis after peripheral infection of hamsters. [en línea]. *BMC Vet. Res.* 3:22 <www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847197/?tool=pubmed> [consulta: 24-11-2011] 8 pp.
21. **Langeveld, J.; Jacobs, J.; Erkens, J.; Bossers, A.; van Zijderveld, F.; van Keulen, F. 2006.** Rapid and discriminatory diagnosis of Scrapie and BSE in retropharyngeal lymph nodes of sheep. [en línea]. *BMC Vet. Res.* 2:19. <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/19>> [consulta: 24-11-2011] 14 pp.

22. **Loiacono, C.; Thomsen, B.; Hall, S.; Kiupel, M.; Sutton, D.; O'Rourke, K.; Barr, B.; Anthenill, L.; Keane, D. 2009.** Nor98 Scrapie identified in the United States. *J. Vet. Diag. Invest.* 21: 454-463.
23. **Mandujano, A.; Montes, S.; Guzmán, A.; Espinosa, B.; Rembao, D.; Martínez-Cairo, S.; Zenteno, E.; Guevara, J. 2006.** Fisiopatología de las enfermedades por priones. *Gac. Méd. Méx.* 142(5): 399-406.
24. **Masullo, C.; Bizzarro, A.; Guglielmi, V.; Iannaccone, E.; Minicuci, G.; Vita, M.; Capellari, S.; Parchi, P.; Servidei, S. 2010.** An atypical phenotype of CJD associated with the E200K mutation in the prion protein gene. *Neurol. Sci.* 31(6): 837-839.
25. **McGovern, G.; Jeffrey, M. 2007.** Scrapie-specific pathology of sheep lymphoid tissues. [en línea]. *PLoS ONE* 2(12) <www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2110901/tool=pubmed> [consulta: 24-11-2011] 10 pp.
26. **Monleón, E.; Monzón, M.; Hortells, P.; Vargas, A.; Acín, C.; Badiola, J. 2004.** Detection of PrPsc on Lymphoid Tissues from Naturally Affected Scrapie Animals: Comparison of Three Visualization Systems. *J. Histochem. Cytochem.* 52(2): 145-151.
27. **Monleón, E.; Acín, C.; Bolea, R.; Monzón, M.; Galindo, I.; Vargas, M.; Badiola, J. 2007.** Detección de animales afectados de Scrapie en focos de erradicación mediante biopsias de tejido linfoide. **En:** Jornadas sobre Producción Animal 12, 16-17 May. 2007. Unidad de Histología y Anatomía Patológica. Universidad de Zaragoza. España. pp: 603-605.
28. **Monleón, E.; Garza, M.; Sarasa, R.; Alvarez-Rodriguez, J.; Bolea, R.; Monzón, M.; Vargas, M.; Badiola, J.; Acín, C. 2011.** An assessment of the efficiency of

PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with Scrapie. *Vet. Microbiol.* 147: 237–243.

29. **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> [Consulta: 13-11-11].
30. **Ortiz-Pelaez, A.; Bianchini, J. 2011.** The impact of the genotype on the prevalence of classical Scrapie at population level. [en línea]. *Vet. Res.* 42(31) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055824/pdf/1297-9716-42-31.pdf>> [consulta: 13-11-11]. 8 pp.
31. **O'Rourke, K.; Baszler, T.; Besser, T.; Miller, J.; Cutlip, R.; Wells, G.; Ryder, S.; Parish, S.; Hamir, A.; Cockett, N.; Jenny, A.; Knowles, D. 2000.** Preclinical diagnosis of Scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin. Microbiol.* 38(9): 3254-3259.
32. **O'Rourke, K.; Duncan, J.; Logan, J.; Anderson, A.; Norden, D.; Williams, E.; Combs, B.; Stobart, R.; Moss, G.; Sutton, D. 2002.** Active surveillance for Scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(5): 966–971.
33. **O'Rourke, K.; Zhuang, D.; Truscott, T.; Yan, H.; Schneider, D. 2011.** Sparse PrPSc accumulation in the placentas of goats with naturally acquired Scrapie. [en línea]. *BMC Vet. Res.* 7(7).<www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-7-7.pdf> [consulta: 24-11-11]. 9 pp.
34. **Pirisinu, L.; Migliore, S.; Di Bari, M.; Esposito, E.; Baron, T.; D'Agostino, C.; De Grossi, L.; Vaccari, G.; Agrimi, U.; Nonno, R. 2011.** Molecular

- discrimination of Sheep Bovine Spongiform Encephalopathy from Scrapie. J. Emerg. Infect. Dis. 17(4): 695-698.
35. **Ryou, C. 2007.** Prions and prion diseases: fundamentals and mechanistic details. J. Microbiol. Biotechnol. 17(7): 1059-1070.
36. **SAG (Servicio Agrícola Ganadero). 2006.** Situación sanitaria animal. División protección pecuaria. Chile. [en línea] <www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagVerRegistro.asp?argInstanciaId=49&argRegistroId=2767> [consulta: 24-11-11]. pp: 1-75.
37. **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.
38. **Sunkesula, S.; Luo, X.; Das, D.; Singh, A.; Singh, N. 2010.** Iron content of ferritin modulates its uptake by intestinal epithelium: implications for co-transport of prions. [en línea]. BMC Mol. brain. 3:14. <<http://www.molecular.brain.com/content/3/1/14>> [consulta: 24-11-2011] 12 pp.
39. **Terry, L.; Howells, L.; Hawthorn, J.; Edwards, J.; Moore, S.; Bellworthy, S.; Simmons, H.; Lizano, S.; Estey, L.; Leathers, V.; Everest, S. 2009.** Detection of PrPsc in Blood from Sheep Infected with the Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy Agents. J. Virol. 83(23): 12552-12558.
40. **Torres, J.; Brun, A.; Castilla, J.; Sanchez-Vizcaíno, J. 2001.** Enfermedades producidas por priones. [en línea]. <www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/bse/priones/priones.htm> [consulta: 24-11-11]. 20 pp.
41. **van Keulen, L.; Bossers, A.; van Zijderveld, F. 2008.** TSE pathogenesis in cattle and sheep. Vet. Res. 39: 24-35.

42. **Vargas, F.; Luján, L.; Bolea, R.; Monleón, E.; Martín-Burriel, I.; Fernandez, A.; De Blas, I.; Badiola, J. 2006.** Detection and clinical evolution of Scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J. Vet. Intern. Med.* 20: 187-193.
43. **Vascellari, M.; Nonno, R.; Mutinelli, F.; Bigolaro, M.; Di Bari, M.; Melchiotti, E.; Marcon, S.; D'Agostino, C.; Vaccari, G.; Conte, M.; De Grossi, L.; Rosone, F.; Giordani, F.; Agrimi, U. 2007.** PrPsc in Salivary Glands of Scrapie-Affected Sheep. *J. Virol.* 81(9): 4872-4876.
44. **Yang, T.; Jung, D.; Ahn, B.; Jeong, B.; Cho, H.; Kim, Y.; Na, D.; Geschwind, M.; Kim, E. 2010.** Familial Creutzfeldt-Jakob disease with V180I Mutation. *J. Korean Med. Sci.* 25: 1097-1100.

ANEXOS.

Anexo 1. Programa de procesamiento aplicado a las muestras de tercer párpado.

ESTACION	REACTIVO	TIEMPO (hr)	VACIO	TEMPERATURA
1	Alcohol 70°	1.5	X	A
2	Alcohol 90°	1.5	√	A
3	Alcohol 95° I	1.5	√	A
4	Alcohol 95° II	1	√	A
5	Alcohol 100° I	1	√	A
6	Alcohol 100° II	1	√	A
7	Alcohol 100° III	1.5	√	A
8	Xilol I	1	√	A
9	Xilol II	1	√	A
10	Xilol III	1	√	A
11	Parafina 1	2	√	57°C
12	Parafina 2	2	√	57°C
T. TOTAL		16 HORAS		A: Temperatura ambiente

Anexo 2. Procedimiento para la tinción H-E.

PASO	TIEMPO (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

Hematoxilina Harris	5
Agua corriente	5
Alcohol ácido 0.1%	20 (seg)
Agua corriente	10
Carbonato de litio 1.5%	Hasta que los núcleos tomen una tonalidad azul
Agua corriente	5
Eosina 2%	5
Alcohol 95°	10 (seg)
Alcohol 100°	1
Alcohol 100°	2
Xilol I	2
Xilol II	2
Xilol III	3

Anexo 3. Protocolo de desparafinización e hidratación.

SOLVENTE	TIEMPO INCUBACIÓN (min)
Xilol	5
Xilol	5
Alcohol 100%	4
Alcohol 100%	4
Alcohol 95%	3
Alcohol 80%	3