



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**APLICACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN ÓBEX DE CAPRINOS
PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS PRIÓNICAS.**

Estefanía Paz Fröhlich Gallardo

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

Profesor Guía: Gustavo Adolfo Farías Roldán

Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2017

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas que hicieron posible esta memoria:

-A mi familia, Ruth, Juan y Susanne, por su apoyo incondicional, por acompañarme en todo momento y ayudarme en todo mi proceso de formación, por toda la confianza que han depositado en mí. Han sido el pilar fundamental para lograr mis metas y el motor que me motiva día a día a crecer.

-A mi padre, Juan Eduardo, por todas las noches de desvelo que trabajaste conmigo, por las revisiones y palabras de aliento, por tu apoyo no tan sólo en este proceso, sino que en todos los momentos de mi vida, por siempre creer en que puedo hacer lo que me proponga. Gracias por no flaquear y permanecer inamovible frente a la adversidad.

-Al Dr. Gustavo Farías, por ser el gestor y motor de esta memoria, por el esfuerzo y apoyo que me brindó a lo largo del tiempo, por la confianza que puso en mí y por ser parte fundamental de mi formación profesional.

-A la Unidad de Patología Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero, por la oportunidad de realizar esta Memoria de Título.

-Al Dr. Claudio Lecocq, por su entusiasmo y por contagiarme el amor por la Patología. Por apoyarme y sus valiosas enseñanzas.

-A las Dras. Cecilia Jara y Paula Núñez, por su apoyo y colaboración durante mi estadía en el laboratorio y por toda la ayuda brindada en cada desafío.

-A Cristian, Mario y Gloria, personal del laboratorio, por toda la ayuda, tiempo compartido y enseñanzas que me entregaron.

- A Paola, Jaqueline y las ayudantes del departamento de patología que me acompañaron y entregaron su aliento durante el proceso.

-Al Dr. Olivares por su disposición y por sus enseñanzas de un área de la Medicina Veterinaria que siempre me ha costado.

-A mis amigos, gracias a su entusiasmo y palabras de aliento pude realizar este trabajo.

-A Macarena Fernandez y Natalia Lermada, por acompañarme, apoyarme y escucharme en todo momento, por su amistad incondicional.

A todos,

MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. GENERALIDADES	3
2. AGENTE CAUSAL	4
2.1 Estructura de las proteínas, <i>Biología Molecular</i>	4
2.2 Etiología.....	5
2.3 Proteína PrP	6
2.4 Desarrollo y propagación de las EETs.....	8
2.5 Función de la PrP.....	9
3. ENFERMEDADES PRIÓNICAS.	10
3.1 Enfermedades priónicas que afectan a los humanos	13
3.2 Enfermedades priónicas que afectan a los animales.....	13
4. SCRAPIE	14
4.1 Generalidades	14
4.2 Factores de Riesgo.....	15
4.3 Transmisibilidad	18
4.4 Patogenia	19
4.5 Patogénesis y distribución tisular de la PrP ^{Sc}	20
4.6 Signos Clínicos.....	24
4.7 Diagnóstico.....	25
4.8 Diagnóstico diferencial.....	28
5. EPIDEMIOLOGÍA	28
5.1 Salud pública	29

5.2 Situación Nacional.....	31
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	36
HEMATOXILINA - EOSINA (H/E).....	38
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).....	38
RESULTADOS	40
EVALUACIÓN DE APTITUD DE LAS MUESTRAS.....	40
ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LAS MUESTRAS DE ÓBEX EN CAPRINOS (H/E):.....	41
ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE ÓBEX EN CAPRINOS (IHQ)	45
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIÓN	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS:

FIGURAS:

Figura 1: Línea de tiempo representando los mayores hitos en la hipótesis de los priones.....	4
Figura 2: Comparación de la isoforma celular (PrP ^C) y la isoforma Scrapie (PrP ^{Sc}).....	8
Figura 3: Posibilidades de ingreso del prión a través de la mucosa intestinal y sus posibles mecanismos de replicación.....	21
Figura 4: a) Esquema de un corte transversal del cráneo para la extracción de cerebro bovino (similar al proceso de extracción en los caprinos). b) Esquema que señala la médula oblongada, zona que contiene el óbex.....	36
Figura 5: Vista dorsal del tronco encefálico, demostrando el corte a nivel de óbex.....	37
Figura 6: a) Esquema anatómico: de óbex y principales núcleos que deberían ser observados en una muestra apta. b) Microfotografía (10x): Sección transversal a nivel del óbex, de una muestra apta, donde se identifican los sitios claves para el diagnóstico por histopatología e inmunohistoquímica.....	40
Figura 7: Microfotografía de un corte a nivel de óbex en la cual se observa la presencia de hemorragias focales.....	42
Figura 8: Microfotografía de un corte a nivel de óbex en la cual se observa la presencia de infiltrado perivascular de células inflamatorias.....	42
Figura 9: Microfotografía de un corte a nivel de óbex en la cual se observa la presencia de células pigmentarias, melanocitos.....	43
Figura 10: Microfotografía de un control negativo de óbex.....	43
Figura 11: Microfotografía de un control positivo de óbex.....	44
Figura 12: a) Microfotografía de un control positivo de óbex de caprino. b) Microfotografía de un control positivo de óbex de ovino.....	46
Figura 13: a) Microfotografía de un control negativo de óbex de caprino. b) Microfotografía de un control negativo de óbex de ovino.....	47
Figura 14: Microfotografía de óbex de caprino. Correspondiente a una muestra en estudio.....	48

TABLAS

Tabla 1: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en las especies.....	12
Tabla 2: Consideraciones sobre la utilización como reproductores de los diferentes genotipos en la Plan Nacional contra el Scrapie de Gran Bretaña.....	17
Tabla 3: Comparación entre el plan anual de vigilancia de enfermedades 2016 y 2017, del SAG..	33
Tabla 4: Resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis histopatológico de muestras de óbex caprino con la tinción H/E.....	44
Tabla 5: Resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis Inmunohistoquímico de muestras y controles en óbex caprino.....	49

RESUMEN

El Scrapie es una enfermedad neurodegenerativa y fatal que afecta a pequeños rumiantes como ovinos, caprinos y muflones. El causante de esta enfermedad es una partícula proteínica infecciosa llamada prión, que se origina por un cambio conformacional de una proteína priónica celular del hospedero (PrP^C). Los programas de vigilancia consideran a la Histopatología como método diagnóstico y a la Inmunohistoquímica (IHQ) como método confirmatorio para el Scrapie.

Esta memoria fue desarrollada en el laboratorio de la Unidad de Patología del Servicio Agrícola y Ganadero de Lo Aguirre. Se utilizaron 50 muestras de óbex de caprinos mayores de 2 años, sin importar raza ni sexo, provenientes de mataderos de la IV Región de Chile. De cada muestra de óbex se obtuvieron cortes seriados con el propósito de destinar uno a la tinción de Hematoxilina y Eosina (H/E), y un corte homólogo a la técnica de Inmunohistoquímica. Así en la tinción H/E se comprobó la aptitud de la muestra evaluada a partir de la observación de la integridad de núcleos nerviosos de presentación bilateral.

En total se trabajó con 50 muestras que fueron sometidas a los métodos tradicionales de histopatología para la tinción de H/E. De éstas, 50 cortes resultaron aptos para aplicar la técnica de Inmunohistoquímica. De los cortes sometidos a IHQ ninguno presentó el precipitado granular rojo característico de la inmunorreacción por la presencia de priones, por lo cual se determinó que todas las muestras de los caprinos estudiados fueron negativas, al igual que los controles negativos de óbex. Por su parte, los controles positivos de óbex siempre presentaron el precipitado granular rojo indicativo de una inmunorreacción positiva, tal como lo había indicado el Centro de Referencia para ese tipo de controles. De esta manera, este trabajo colaboró con la vigilancia pasiva anual que realizó el Servicio Agrícola y Ganadero durante el año 2015, con respecto a la detección de priones en la especie caprina en un determinado grupo de animales de nuestro país.

Palabras claves: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, Scrapie, Prión, Óbex, Inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Scrapie is a neurodegenerative and fatal disease, affecting small ruminants such as sheep, goats and mouflons. The cause of these diseases is an infectious proteinaceous particle called prion, which originates from a conformational change of a prion cellular protein of the host (PrP^C). Surveillance programs consider histopathology as the diagnostic method and Immunohistochemistry (IHC) as a confirmatory method for Scrapie.

This study was developed in the Laboratory of Pathology Unit of the Agricultural and Livestock Service of Lo Aguirre. Fifty obex samples of goats, older than 2 years, regardless of race or sex, were used from slaughterhouses in IV Region of Chile. Serial sections were obtained from each obex sample in order to assign one slice to the Hematoxylin and Eosin staining (H/E) and its homologous slice to the Immunohistochemistry technique. Thus, in the H/E staining the suitability of the slices were evaluated, from the observation of the integrity of the following nerve nuclei, with bilateral presentation: of the solitary tract, parasympathetic of the vagus nerve, of the spinal tract of the trigeminal nerve and motor of the hypoglossus.

In total, 50 slices were performed, which were subjected to the traditional methods of histopathology and H/E staining. Of these, 50 were able to apply the technique of Immunohistochemistry (IHC). Of the samples submitted to IHC, none of them presented the red granular precipitate characteristic of the immunoreaction due to the presence of prions, whereby it was determined that all samples of the goats studied were to be classified as negative, as were the negative controls of Obex. On the other hand, positive obex controls always presented the red granular precipitate indicative of a positive immunoreaction, as indicated by the Reference Center for such controls. In this way, this work collaborated with the annual passive surveillance carried out by the Agricultural and Livestock Service during the year 2015, regarding the detection of prions in the goat species in a determined group of animals of our country.

Key words: Transmissible Spongiform Encephalopathies, Scrapie, Prion, Obex, Immunohistochemistry.

INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) o enfermedades priónicas son un grupo de patologías neurodegenerativas fatales de carácter progresivo, que afectan a un gran número de mamíferos como por ejemplo ovinos y caprinos (Scrapie), bovinos (Encefalopatía Espongiforme Bovina o EEB) y humanos (Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), entre otros. El agente etiológico de estas enfermedades es una proteína infecciosa llamada prión descrita, por Prusiner (1998), como una proteína hidrofóbica.

El Scrapie, que es el prototipo de las EETs, fue descubierto hace más de 250 años en Gran Bretaña y otros países de Europa del Este, y afecta tanto a ovinos, caprinos como a muflones. La incidencia descrita en los caprinos es baja en comparación con la del ganado ovino, esto puede ser resultado de la escasa vigilancia que se ha dado en la especie. La importancia de esta especie comenzó a surgir en el momento en que se detectó que un caprino con la enfermedad, puede propagar el Scrapie entre su especie y también a los ovinos.

A nivel internacional, la inmunohistoquímica (IHQ), es el método *gold* estándar de detección de Scrapie en los caprinos, esta técnica detecta priones en el tejido del sistema nervioso central o en linfonodos. En otras especies como bovinos u ovinos existen además de la IHQ otras pruebas diagnósticas, como el *Western blot* o el test de Inmunoensayo enzimático (ELISA¹).

Las EETs, están estrechamente relacionadas con la variante infecciosa de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en los humanos, debido a que es una zoonosis causada por el consumo de productos animales contaminados con EEB. Esto genera preocupación en las naciones con respecto a las EETs, lo que ha llevado a restricciones comerciales que han impactado negativamente a las industrias bovinas, ovinas y caprinas.

¹ ELISA: acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

Chile está clasificado en la categoría de riesgo insignificante para la EEB, sin embargo, no existe un estatus sanitario declarado con respecto al Scrapie en la especie caprina. Por esto, el principal objetivo fue contribuir a la vigilancia pasiva anual para esta patología debido a que los caprinos son una especie considerada reservorio para el prión. Así, mientras más avanza la tecnología y existe una mayor investigación sobre el Scrapie, se podrá controlar de mejor forma esta enfermedad, de allí la importancia de realizar una vigilancia activa anual para ampliar el conocimiento del estatus sanitario del país y contribuir a los estudios epidemiológicos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Generalidades

El grupo de las enfermedades causadas por priones se conoce como Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) y han sido incluídas dentro de las enfermedades neurodegenerativas (Andresen, 2009). El Scrapie fue el primer miembro del grupo de las EETs, las cuales afectan tanto a animales como humanos. Se originó en algún lugar de Europa durante la Edad Media tardía (Mastrianni, 2014). Se describió por primera vez en el siglo XVIII en Inglaterra y en Alemania como una enfermedad de ovinos que no se transmitía experimentalmente. Probablemente su introducción en Inglaterra provino desde la importación de ovinos de raza merino española que eran altamente susceptibles a dicha enfermedad (Schneider *et al.*, 2008). Su forma análoga en el humano fue descrita en 1920 por los neurólogos alemanes Creutzfeldt y Jakob (Brown, 2013).

Prusiner en 1982, propuso al prión como agente causal de las EETs. Sus experimentos para encontrar el agente causal de éstas enfermedades lo llevaron a descubrir que no eran causadas por un “virus lento” como se creía, debido a que no era inactivado con agentes que sí inactivaban a los ácidos nucleicos que forman parte de la estructura de los virus, lo que lo llevó a proponer la hipótesis de una proteína infecciosa o prión, por la ausencia de ácidos nucleicos (Schneider *et al.*, 2008).

Los avances científicos de los últimos años han demostrado que una proteína mal plegada es el componente activo del agente patógeno y que la propagación de las EETs y sus características únicas, dependen de la autorreplicación del plegado infeccioso de la proteína priónica (Soto, 2011).

En la Figura 1 se observa una línea de tiempo donde se destacan los años más importantes en la investigación de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs):

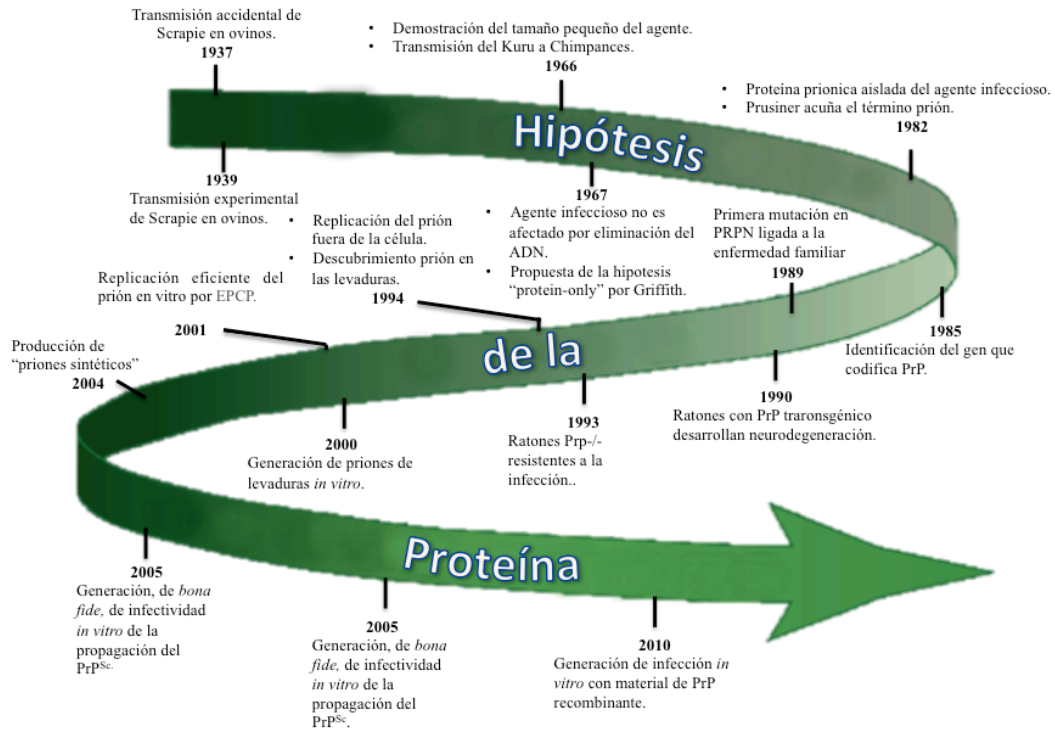


Figura 1: Línea de tiempo que representa los mayores hitos en la hipótesis de los priones. Indicando inicialmente que las enfermedades priónicas son transmisibles debido a la transmisión accidental del Scrapie en ovinos, terminando con la demostración de que el material infeccioso puede ser generado *in vitro* usando sólo proteína priónica recombinante (Soto, 2011).

2. Agente Causal

2.1 Estructura de las proteínas, Biología Molecular.

La base de la biología molecular dice que la estructura primaria de las proteínas son la secuencia covalente lineal de aminoácidos que las constituyen; estas están contenidas en las cadenas de ADN en los cromosomas de los diferentes organismos (Rey-Gayo y Calbo, 2002). Las proteínas con grupos químicos tan diferentes, en un medio principalmente acuoso, producen una gran diversidad de interacciones de distinta naturaleza. Como consecuencia de las mismas, se pliegan, adquiriendo una conformación tridimensional única, denominada estructura terciaria (Whitford, 2005). A pesar de los avances producidos en los últimos años el problema del plegamiento de proteínas permanece sin resolver (Rey-Gayo y Calbo, 2002).

Para entender las características patológicas del plegamiento de una proteína se deben desarrollar dos aspectos: primero, si se produce una mutación en la secuencia de un gen en los cromosomas y dependiendo de la posición que ocupe este nuevo aminoácido en la estructura plegada original, ésta puede permanecer inalterada, presentar cambios mínimos para adaptarse a la nueva cadena lateral o perder sus propiedades totalmente, imposibilitando con ellos la función de la proteína en el organismo (Rey-Gayo y Calbo, 2002). Por otra parte, la estructura plegada de una proteína debe considerarse como una estructura “frágil”, ya que está sujeta a numerosos factores que pueden afectarla: los cambios en la secuencia, los aumentos de temperatura, los cambios bruscos de pH, la presencia de concentraciones elevadas de ciertos iones o de determinadas sustancias químicas (urea, detergentes, algunos alcoholes, entre otros) que afectan el equilibrio de las interacciones que estabiliza la estructura terciaria, originando la destrucción de la misma (Dobson, 1999; Rey-Gayo y Calbo, 2002). La secuencia química de las proteínas no se ve afectada, pero el ovillo plegado se deshace produciendo conformaciones abiertas e inestables (Dobson, 1999).

En algunas circunstancias algunas cadenas de proteínas desnaturalizadas pueden unirse entre sí, formando depósitos de agregados insolubles que pueden afectar o incluso destruir las células, produciendo el desarrollo de enfermedades (Rey-Gayo y Calbo, 2002).

A partir de la información anterior se puede entender de una forma más acabada el agente etiológico de las EETs.

2.2 Etiología

Inicialmente se consideró que debido a los largos periodos de incubación de las EETs, que éstas eran causadas por “virus lentos” (Schneider *et al.*, 2008). Sin embargo, al analizar las propiedades de los agentes, estos mostraron características diferentes a los agentes infecciosos habituales, como la falta de respuesta inflamatoria y la ausencia de respuesta inmunológica del huésped (Prusiner *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2008). Además, el agente causal mantiene su infectividad frente a distintos agentes como: nucleasas; elevadas temperaturas y radiaciones de alta energía (UV o ionizante); siendo parcialmente

resistentes a las proteasas. Lo que hizo suponer, que en el caso de las EETs, se enfrentaban a un agente desconocido (Prusiner *et al.*, 1998; Hunter, 2007; Schneider *et al.*, 2008).

Una vez descartadas otras posibilidades, Prusiner propuso la denominada *protein only hypothesis*, según la cual el agente transmisor de las EETs es una proteína, denominando prión² o partícula infecciosa proteica, desprovista por tanto de ácidos nucleicos. En notación científica, esta proteína se denota como PrP o *prion protein* (Soto, 2011).

Según esta hipótesis, una proteína puede actuar como agente infeccioso de una enfermedad, debido a que el prión, puede tener dos formas diferentes: una denominada PrP^C (de celular) o PrP^{Sen} (de sensible). La proteína normal PrP^C es susceptible a ser desnaturalizada mediante los procedimientos habituales; en cambio su isoforma que corresponde a un plegamiento distinto denominada PrP^{Sc} (de Scrapie) o PrP^{Res} (de resistente), presenta una elevada estabilidad frente a muchos de los agentes que desnaturalizan habitualmente las proteínas, salvo que se utilicen condiciones extremas (Soto, 2011). Esta estabilidad se debe a que las moléculas de la PrP^{Res} se unen unas a otras, formando agregados filamentosos conocidos como SAF (*scrapie associated fibrils*). Estos agregados protegen a la "conformación incorrecta de estas proteínas" de la acción de las proteasas y de otros agentes desnaturalizantes. Es importante destacar que no se ha detectado ninguna diferencia o modificación entre la secuencia de aminoácidos de la proteína prión, en sus dos plegamientos PrP^C y su isoforma patológica PrP^{Sc} (Rey-Gayo y Calbo, 2002).

2.3 Proteína PrP

El análisis de las fibrillas SAF permitió la identificación incompleta de la secuencia de aminoácidos que constituyen la proteína del prión y su determinación permitió la búsqueda del gen que la codifica, que se encuentra en el genoma del huésped (Hunter, 2007; Cacace, 2011; Zou, 2013). Esta proteína se expresa en numerosos órganos del huésped, en los que

²acrónimo en inglés de: *proteinaceous infectious particle*

se ha detectado la forma PrP^C, existiendo un claro depósito de ésta en el tejido neuronal. Además, se ha encontrado en todas las especies de mamíferos en las que se ha buscado y en algunas aves y reptiles. Las diferencias en la secuencia de la proteína entre las distintas especies son pequeñas, con más del 85% de homología entre los diferentes mamíferos (Hunter, 2007; Cacace, 2011).

El tamaño de la PrP es de poco más de 200 aminoácidos tanto en su "forma sensible" como en su "forma resistente". Esta ha permitido el análisis de la estructura tridimensional de su "forma sensible" que es soluble en medio acuoso, una característica fundamental para poder aplicar la técnica de resonancia magnética para su estudio (Requena y Wille, 2014). En los mamíferos su estructura es bastante semejante, aunque en los primeros 90-100 aminoácidos se manifiesta una elevada flexibilidad, la unión a los iones Cu²⁺ parece inducir en esta parte de la proteína una estructura helicoidal, pero que no es en absoluto rígida. La segunda mitad de la proteína muestra una estructura mucho más definida donde se observan tres α hélices y una mínima lámina β (Millhauser, 2013; Requena y Wille, 2014).

Por el contrario, la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} no se conoce con detalle debido a su insolubilidad, sólo se dispone de información espectroscópica de baja resolución (Requena y Wille, 2014). Ésta presenta un contenido α hélice del 30% y un 43% en lámina β . Como comparación, la PrP^C presenta el 42% de estructura α y sólo el 3% de β , como se puede observar en la Figura 2. De la digestión parcial con proteasas de las fibrillas SAF se ha aislado, mediante electroforesis, una proteína de menor tamaño, denominada PrP 27-30, la cual se corresponde con la eliminación de los primeros 60-70 aminoácidos (Requena y Wille, 2014) y que presenta el 21% de estructura α y el 54% de estructura β (Zou, 2013).

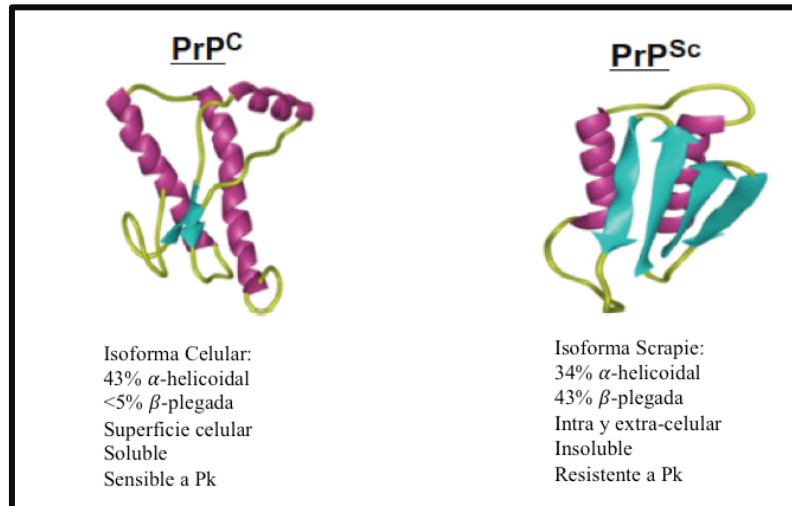


Figura 2: Comparación de la isoforma celular (PrP^C) y la isoforma Scrapie (PrP^{Sc}) (Zou, 2013; Mastrianni, 2014).

Esto refuerza la hipótesis del cambio conformacional de la PrP en el paso de su "forma celular" a la "patógena". Además, el alto contenido en estructura β de esta última es compatible con otras proteínas responsables de enfermedades en las que aparecen depósitos de placas amiloides, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer (Westergard *et al.*, 2007; Zou, 2013).

De acuerdo con la hipótesis de Prusiner, el contacto entre dos moléculas de proteína del prión una normal y otra patógena, induce un cambio conformacional en la primera que también pasa a adquirir la forma resistente (Zou, 2013). De esta forma se produce una "reacción en cadena", que conduce paulatinamente a la desaparición de la PrP^C y al crecimiento de las fibrillas SAF. La acumulación de éstas origina el daño neuronal característico de las EETs (Westergard *et al.*, 2007; Zou, 2013)

2.4 Desarrollo y propagación de las EETs

De lo anterior se desprende que las EETs se desarrollan por medio de un "cambio conformacional" (Mastrianni, 2014). Esta transformación es inducida por el contacto entre las dos isoformas de la PrP. La ausencia de cualquiera de ellas impide por tanto el desarrollo de la enfermedad. A pesar de lo anterior, existen una serie de hipótesis razonables para el mecanismo de esta transformación y su propagación (Soto, 2011).

La primera es su "forma hereditaria", que se asocia a la presencia de ciertas mutaciones en el gen PRNP que codifica la PrP. Las mutaciones son mucho más habituales que el escaso número de individuos que desarrollan la enfermedad y la presencia de éstas no implica que vaya a inducir automáticamente el desarrollo de la enfermedad. Así es como la enfermedad se manifiesta en el humano a una edad superior a los 50 años (Mastrianni, 2014).

El segundo caso es el ingreso exógeno del agente donde existen una serie de factores desconocidos en el mecanismo molecular del desarrollo de la enfermedad. Aún sin evidencias se plantea que el "cambio conformacional" se produce por una nucleación, donde una molécula de PrP^C se une a un agregado con un cierto número de moléculas de PrP^{Sc} (Requena y Wille, 2014). Éste actúa como "plantilla tridimensional", para inducir la desnaturalización parcial o total de la forma celular, su cambio conformacional y su incorporación al núcleo patógeno en crecimiento (Farías, 2013; Moda *et al.*, 2013). Si bien no se han detectado directamente otras moléculas presentes en esta transformación, no se descarta totalmente su presencia. Incluso es posible que la presencia de cationes metálicos como el Cu²⁺ pudieran participar en éste (Millhauser, 2013).

Tampoco está claro el tema de las "cepas" en la propagación de las EETs. Éstas se refieren a la presencia, dentro de la misma enfermedad, de diferentes cuadros clínicos y distintas velocidades de incubación (Biasini y Harris, 2013).

2.5 Función de la PrP

A pesar de la información disponible para la PrP, la función de su forma celular constituye todavía un tema controversial (Requena y Wille, 2014). El estudio en ratones transgénicos, en los que se ha suprimido el gen que la codifica, no ha mostrado demasiadas alteraciones en su comportamiento, aunque se han publicado algunos datos referentes a anomalías en los ritmos circadianos (Millhauser, 2013). Sin embargo, las investigaciones se centran en una serie de patrones repetitivos (cada 8 aminoácidos) en la estructura primaria, situados en la primera mitad de la proteína, que presentan una afinidad específica hacia los iones Cu²⁺ (Benetti y Legname, 2015). Probablemente la proteína PrP^C desempeñe una función

importante en el metabolismo del cobre y con él, en posibles mecanismos de protección de las uniones sinápticas ante procesos oxidativos (Westergard *et al.*, 2007).

Las investigaciones siguen encontrando importantes roles funcionales de la PrP^C, como que: apoya el desarrollo de la mielina, influencia los ritmos circadianos del sueño, aumenta su concentración en los sitios de injuria isquémica, promueve el desarrollo neuronal y protege las células nerviosas de los ataques químicos y oxidativos (Millhauser, 2013). Aunque todavía no se puede asignar una única función para la PrP^C como, por ejemplo, una molécula de señalización, una enzima o un transportador, está claro que se requiere la proteína para la función neurológica normal (Millhauser, 2013). Investigaciones más funcionales enlazan la PrP^C a la unión de iones metálicos, específicamente para el cobre y el zinc (Westergard *et al.*, 2007). Este enlace se enfatizó en un estudio de fluorescencia de rayos X que examinó la localización espacial y los niveles relativos del hierro, cobre y zinc en el cerebro de ratones (Westergard *et al.*, 2007).

Cada uno de estos iones metálicos tiene un perfil PrP-dependiente único para regiones específicas del cerebro. Por ejemplo, la PrP parece manejar los niveles de cobre cerca de los ventrículos y el tálamo por otro lado el zinc aumenta en las regiones corticales. Si bien hay poca evidencia que sugiere que la PrP se une directamente al hierro, los niveles son influenciados por la expresión de PrP, lo cual sugiere una relación entre los transportadores de los distintos metales (Westergard *et al.*, 2007).

3. Enfermedades priónicas

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), corresponden a una de las patologías menos comprendidas que afectan el sistema nervioso de los humanos y animales. Las EETs son entidades neurodegenerativas de muy lenta progresión con periodos de incubación muy largos que van entre los 2 a 10 años y siempre son fatales. Desarrollan características histopatológicas comunes como: vacuolización neuronal y del neuropilo, astrogliosis, amiloidosis, presentando un alto grado de similitud entre las especies afectadas (Castilla *et al.*, 2002; Farías, 2013).

Las EETs, en relación con el resto de enfermedades contagiosas, presentan una serie de características que les confieren una alta especificidad como: la ausencia de reacción inflamatoria; imposibilidad de detección en el individuo vivo y una extraordinaria resistencia del agente causal a los sistemas habituales de esterilización físico-química, lo que dificulta su control (Corbière *et al.*, 2013). Pueden ser clasificadas como hereditarias, infecciosas y esporádicas (Farías, 2013). Las de tipo hereditarias son aquellas provocadas por alteraciones genéticas heredables y su presentación se debe a una mutación en el gen que codifica la proteína priónica (PrP), lo cual termina facilitando el plegamiento erróneo de la PrP^C. Las infecciosas o adquiridas son producto del ingreso al organismo de un prión exógeno que interactúa con la PrP^C, proteína que se transforma en una nueva PrP^{Sc}. Y las esporádicas suceden cuando se presentan sin una causa aparente o evidencia de una mutación puntual o de infección exógena por la PrP^{Sc}, cuyo origen no tiene una explicación clara (Brown y Mastrianni, 2010).

Las enfermedades causadas por priones se han reconocido en diversas especies, es así como se describen en los humanos donde se destacan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y su variante (ECJ^V) entre otras; mientras que entre las principales enfermedades de los animales están: la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) y el Scrapie que afecta a caprinos, ovinos y muflones (Wadsworth *et al.*, 2011).

Las EETs se han reconocido en diversas especies, entre ellas humanas y animales, las cuales se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en las especies.

Nombre (a)	Hospedador	Mecanismo de transmisión	Año reconocido
ECJ^e	Humano	Espontáneo; mutación somática o conversión espontánea de PrP ^C a PrP ^{Sc} .	1920
ECJ^f	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1924
ECJⁱ	Humano	Infeccioso; exposición a equipo quirúrgico infectado con priones; trasplante de tejidos; transfusión sanguínea; terapias con hormona de crecimiento humana.	1974
ECJ^v	Humano	Infecciosa; exposición a alimentos infectados con EEB.	1996
SGS	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1936
Kuru	Humano (Papua Nueva Guinea)	Infeccioso; exposición a tejidos contaminados del hombre durante rituales de canibalismo.	1957
IFF	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1986
IF^S	Humano	Desconocido; espontáneo; mutación somática o conversión espontánea de PrP ^C a PrP ^{Sc} .	1997
Scrapie	Ovejas y cabras	Infeccioso; ingestión o contacto con animales, tejidos o secreciones con Scrapie; ambiente contaminado; exposición oral.	1732
ETV	Visón	Infeccioso; ingestión de alimentos contaminados con priones.	1947
EDC	Ciervo, Alce, ratón	Desconocido; infeccioso, espontáneo; contacto o ingestión con priones.	1967
EEB	Bovinos	Infeccioso; ingestión de alimentos contaminados con priones.	1986
EUE	Kudu, Gemsbok Oryx, Nyala, ungulado exótico	Infeccioso; contacto con alimentos o tejidos contaminados con EEB.	1986
EEF	Gato, tigre, león, puma, chita	Infeccioso; ingestión de alimentos contaminados con priones.	1990

(a) ECJ^e (Enfermedad de Creutzfeld- Jacob esporádica), ECJ^f (familiar), ECJⁱ (iatrogénica), ECJ^v (variante); SGS (Síndrome de Gersmann'Straussler-Scheinker); IFF (Insomnio Familiar Fatal), IF^S (esporádico); ETV (Encefalopatía Transmisible del Visón); EDC (Enfermedad del Desgaste Crónico); EEB (Encefalopatía Espongiforme Bovina); EUE (Encefalopatía de Ungulados Exóticos); EEF (Encefalopatía Espongiforme Felina) (Ryou, 2007).

3.1 Enfermedades priónicas que afectan a los humanos

Las enfermedades priónicas que afectan a humanos, se subdividen sobre la base de su signología clínica y de las características neuropatológicas que presentan (Fariás, 2013). Dentro de las EETs se encuentran el Kurú producido por canibalismo (Prusiner, 1998; Ryou, 2007), el síndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker asociado a mutación del gen PRNP (Brown y Mastrianni, 2010), el insomnio familiar fatal producido por una mutación en el codón 178 del gen PRNP (Ryou, 2007; Capellari *et al.*, 2011), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y su variante (ECJ^V), esta última en la actualidad se clasifica como infecciosa al estar directamente relacionada con la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) constituyendo así una zoonosis, donde el prión superó la barrera interespecie, pudiendo contagiar a los humanos (Ryou, 2007; Vaccari *et al.*, 2009).

3.2 Enfermedades priónicas que afectan a los animales

Numerosas especies animales se ven afectadas por diversas encefalopatías espongiformes transmisibles, tal es el caso del Scrapie que afecta a ovinos y caprinos, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), la encefalopatía transmisible del visón (ETV), la enfermedad del desgaste crónico (EDC) en ciervos y alces, y la encefalopatía espongiforme felina (EEF) que afecta a diferentes felinos, entre otras (Wadsworth *et al.*, 2011).

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

El diagnóstico realizado por la técnica de IHQ, se basa en la combinación de técnicas anátomo-patológicas, inmunológicas y bioquímicas, permitiendo localizar componentes tisulares *in situ*, mediante el empleo de anticuerpos específicos y moléculas marcadoras. Según los laboratorios de referencia de la Comisión Europea para las EETs, el principio teórico de la aplicación de la IHQ en las muestras fijadas en formalina, consiste en la búsqueda de epítopes y la utilización de anticuerpos elaborados específicamente para priones (OIE, 2012).

4. Scrapie

4.1 Generalidades

El Scrapie es el más común de las EETs, el cual afecta a los ovinos, caprinos y muflones a nivel mundial. Como todas las otras enfermedades causadas por priones, el Scrapie es una enfermedad neurodegenerativa y eventualmente fatal (Fast y Groschup, 2013). Esta enfermedad esta asociada a un rango de signos clínicos desde sutiles anormalidades del comportamiento a signos neurológicos más evidentes. El diagnóstico clínico necesita ser confirmado por la demostración de lesiones espongiiformes “patognomónicas” y la inmunodetección del PrP^{Sc}, depositadas primariamente en el SNC (OIE, 2013a).

Es endémica en muchos países europeos del Este y ha sido también reportada en diversos países de otros continentes. Sin embargo, Australia y Nueva Zelanda han mantenido su condición de países libres de Scrapie debido a sus rigurosas medidas de control (OIE, 2016a,d).

Es una enfermedad cuyo conocimiento es limitado en la especie caprina, a pesar de que su primera observación fue en Francia el año 1942 en un animal con sintomatología compatible, que vivía junto a un rebaño de ovinos, los cuales presentaban la enfermedad desde hace años (Vaccari *et al.*, 2009). Actualmente hay tres clasificaciones de las enfermedades priónicas naturales que afectan a los caprinos en Europa (Farías, 2013; Cifuentes, 2014). Éstas se distinguen en base a características inmunobioquímicas como Scrapie clásico, atípico y tipo EEB (Fast y Groschup, 2013). En la medida que las técnicas útiles para diferenciar las cadenas del prión mejoren, seguramente aparecerán otro tipo de EETs en caprinos (Vaccari *et al.*, 2009).

La susceptibilidad al Scrapie, en los caprinos, está determinada por el polimorfismo en codones específicos derivados del gen que codifica para la proteína priónica (PRNP) (Cifuentes, 2014). En caprinos se ha establecido que el riesgo de infección sería mayor en animales homocigotos para Isoleucina en el codón 142, que para aquellos que portan Metionina en la misma posición. Sugiriendo que la Metionina tendría un efecto de protección parcial para el desarrollo de la enfermedad en esta especie (Vaccari *et al.*, 2009; Cifuentes, 2014).

En relación al cuadro clínico en caprinos, éste se caracteriza por presentar episodios de cambio conductual, rasquido que es de menor intensidad al ser comparado con el que se presenta en los ovinos, pérdida de peso, pasando al desarrollo de la signología nerviosa como lo es el tremor y ataxia, y luego la postración con la consecuente muerte del animal (DEFRA, 2008; Farías, 2013; Fast y Groschup, 2013).

Las vías de transmisión en esta especie ocurren vertical y horizontalmente. La infección de las crías ocurre en el momento del parto y posiblemente en el periodo prenatal. Al momento del parto las membranas fetales, como la placenta, son una fuente importante de infección horizontal, especialmente cuando las zonas de parto están en áreas confinadas (Terry *et al.*, 2011; Cifuentes, 2014).

Dentro de los diagnósticos diferenciales, especialmente en la fase temprana de la presentación de los signos clínicos, se encuentran la enfermedad de Aujesky o pseudorabia, el ectoparasitismo, la rabia, encefalitis por listeriosis, Maedi Visna, cetosis, hipomagnesemia e intoxicaciones químicas y por plantas (OIE, 2016a;b).

4.2 Factores de Riesgo

Genética

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que la transmisión del Scrapie clásico requiere ovinos y caprinos genéticamente susceptibles. Por lo tanto, el principal factor de riesgo de infección de Scrapie en ovinos y caprinos, a pesar de la forma de infección con el agente, es la susceptibilidad genética de estos (Fast y Groschup, 2013). Para esto los esfuerzos de erradicación de la enfermedad se han centrado en el estudio de los diferentes genotipos presentes en especies y sus distintas susceptibilidades a la infección (Brown, 2013; Fast y Groschup, 2013).

Gran parte del estudio en el control genético del huésped y la transmisibilidad del Scrapie se ha realizado en roedores, debido al gasto económico y la manipulación que conllevan los experimentos realizados con animales de granja. Por esto se hizo un símil entre los descubrimientos genéticos realizados en roedores con los definidos en ovinos (González *et al.*, 2009).

En el año 1968 fueron propuestos los efectos de dos genes en ratones infectados experimentalmente. El primero, un gen llamado gen-Sinc (gen de incubación de Scrapie) que tiene efecto en el largo del periodo de incubación y su gen homólogo en ovinos llamado gen-Sip (gen de periodo de incubación de Scrapie) (Westaway *et al.*, 1987). Eventualmente, diferentes polimorfismos del PRNP fueron comparados en los 80 y 90 con los genes-Sip/Sinc (Westaway *et al.*, 1987).

En ovinos el PRPN consiste en dos alelos, sA (periodo de incubación corto) y pA (periodo de incubación prolongado), que se diferencian primariamente en la secuencia de aminoácidos codificada en el codón 136 . Similar al ratón, el largo del periodo de incubación es dependiente de la cepa de Scrapie que es utilizada (Hunter *et al.*, 1994). Además, en animales susceptibles, los efectos en el periodo de incubación también pueden ser resultado de polimorfismos en los codones 154 y 171 (Hunter, *et al.*; 2000). Así, el periodo de incubación esta determinado al menos por dos factores: el genotipo del hospedero y la cepa del agente.

Existen cinco grupos de riesgo en ovinos que se resumen en la Tabla 2, y éstos son las bases de la cría de ovinos y los programas de erradicación de Scrapie aplicados en la Unión Europea. El mayor riesgo de desarrollar la enfermedad es en animales VRQ/VRQ, y la mayor resistencia genética esta asociada a ovinos ARR/ARR (Jeffrey y González, 2007; González *et al.*, 2014a). Sin embargo, existen restricciones en estos estudios como, por ejemplo, dos ovinos ARR/ARR de diferentes rebaños en Francia y Alemania han demostrado ser portadores subclínicos del Scrapie clásico (Jeffrey y González, 2007; González *et al.*, 2014a). El sistema de clasificación descrito anteriormente no sirve para la forma de Scrapie atípico.

Tabla 2: Consideraciones sobre la utilización como reproductores de los diferentes genotipos en la Plan Nacional contra el Scrapie de Gran Bretaña.

Genotipo (a)	Susceptibilidad/Resistencia
ARR/ARR	Se considera el genotipo más resistente al Scrapie.
ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	Animales considerados genéticamente resistente pero que deben manejarse con cuidado si pretenden ser utilizados como reproductores.
ARQ/ARH ARQ/AHQ AHQ/AHQ ARH/ARH AHQ/ARH ARH/ARQ*	Animales con escasa resistencia al Scrapie que podrán ser utilizados como reproductores libremente sólo hasta finales del año 2004. Posteriormente, con la excepción de los señalados con *, se utilizarán para reproducción por un periodo máximo de 3 años o hasta el final de su vida.
ARR/VRG	Animales genéticamente susceptibles al Scrapie pero que podrán, ocasionalmente, ser utilizados como reproductores en el contexto de un programa de mejora aprobado.
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	Animales muy susceptibles al Scrapie que deberán ser sacrificados o castrados.

Resumen de grupos de riesgo en ovinos, desde mayor susceptibilidad a Scrapie a menor susceptibilidad (a) A: Alanina, R: Arginina, Q: Glutamina, H: Histidina, V: Valina, I: Isoleucina, M: Metionina, N: Asparagina, S: Serina, D: Aspártico, K: Lisina. (Fast y Groschup, 2013).

Aunque la secuencia de aminoácidos en el PrP de ovinos y caprinos silvestres son similares, la genética del PrP en cabras es mucho más variable, sin embargo, sorprendentemente sin los polimorfismos en los codones 136 y 171. Se han encontrado en diferentes países y razas de caprinos, otros 29 polimorfismos del PRPN caprino, resultando en cambios aminoácidos (Vaccari *et al.*, 2006). Al menos cinco de ellos parecen estar asociados a la susceptibilidad a las EETs:

- Haplotipos I142M tienen un periodo de incubación prolongado luego de la inoculación experimental y están asociados con el aumento de la resistencia al Scrapie clásico bajo condiciones naturales (Barillet *et al.*, 2009).
- Haplotipos R154H son asociados con cierta resistencia al Scrapie clásico en diferentes razas y países (Vaccari *et al.*, 2006; Barillet *et al.*, 2009) pero comparativamente tiene alto riesgo asociado al Scrapie atípico (Vaccari *et al.*, 2006; Barillet *et al.*, 2009).

–Polimorfismos N146S/D codifican bajo riesgo (cierta resistencia) a la infección con Scrapie, pero este genotipo está confinado en cruces de caprinos Damascus/Damascus, principalmente en Chipre (Vaccari *et al.*, 2006).

–Haplotipos R211Q han demostrado una resistencia aumentada al Scrapie clásico en estudios franceses de casos-control (Barillet *et al.*, 2009).

–Haplotipos Q222K están asociados con la protección contra el Scrapie clásico en varias razas y países, pero se han reportado los animales heterocigotos infectados (Vaccari *et al.*, 2006; Barillet *et al.*, 2009).

En este momento se consideran candidatos para razas resistentes a las EETs los haplotipos N146S/D y 222K y para los consiguientes programas de erradicación para los caprinos (Fast y Groschup, 2013).

En resumen, el número de variables que influyen la susceptibilidad al Scrapie son muchas y no sólo dependen del genotipo del hospedador y del agente infeccioso, sino también depende de los rebaños individuales, razas y localización geográfica, tampoco se debe olvidar los efectos de la dosis y la ruta de inoculación.

4.3 Transmisibilidad

Las enfermedades priónicas pueden ser adquiridas por transmisión horizontal, de forma esporádica o pueden originarse genéticamente de forma autosomal dominante (van Keulen *et al.*, 2008). La evidencia actual indica que la clave en los eventos de la patogénesis de todas las formas de las enfermedades priónicas es el cambio conformacional de la forma normal de la proteína celular priónica (PrP^c) a su isoforma patogénica (PrP^{Sc}). La PrP^{Sc} se acumula en el sistema nervioso central en agregados amiloides, se cree que esta forma se puede propagar por sí misma imprimiendo su conformación anormal sobre las moléculas de PrP^c (Weissmann *et al.*, 2011).

En los últimos siglos se ha llevado a cabo una larga discusión sobre la forma de transmisión del Scrapie (Schneider *et al.*, 2008) y hasta ahora no se han resuelto completamente las rutas de transmisión de la enfermedad. Se sabe que el Scrapie se puede transmitir horizontalmente entre ovejas bajo condiciones naturales. Esto ocurre por contacto directo o a través del ambiente. La ruta oral de infección es la más eficiente (van Keulen *et al.*,

2008). El Scrapie en caprinos se encuentra comúnmente en mezcla de rebaños con ovinos, pero también se ha observado su propagación entre caprinos (Wood *et al.*, 1992).

La mayor fuente de infección es la placenta infectada. La infectividad y el PrP^{Sc} se ha detectado en partes fetales, dependiendo del genotipo de la descendencia (Andréoletti *et al.*, 2002). Por una parte, resultados provenientes de distintos estudios indican que la infección intra uterina no ocurre antes del parto. La placenta y el líquido amniótico son derramados al ambiente durante el parto y pueden ser ingeridas por otros animales, ésta se sigue asumiendo como la forma de infección más importante entre los rebaños (Andréoletti *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha demostrado que el agente del Scrapie sigue siendo infeccioso, incluso después de años de permanecer en el ambiente (Brown y Gajdusek, 1991).

Existen datos que indican que la infectividad en el ambiente puede sobrevivir por más de 16 años (Georgsson *et al.*, 2006). Resultados adicionales indican que la PrP^{Sc} liberada al ambiente se puede mantener en la superficie del suelo y unirse a los minerales del suelo, los cuales pueden ser consumidos durante el pastoreo de los animales (Johnson *et al.*, 2006). Se ha demostrado que además en la placenta, el líquido amniótico, las fecas (Terry *et al.*, 2011) y la leche (Brown y Gajdusek, 1991), contienen PrP^{Sc} y son infectivos. También se ha encontrado en la cavidad oral de ovejas infectadas (Konold *et al.*, 2008) y se ha demostrado a través de modelos en hámster y ratones la presencia del PrP^{Sc} y/o la infectividad en la orina de ovinos infectados (Gonzalez-Romero *et al.*, 2008). Otras rutas de infección artificial que incluyen la transmisión vía inoculación subcutánea, exposición conjuntival, escarificación de la piel y por transfusiones sanguíneas (Caramelli *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2014b). Algunas infecciones de Scrapie son consecuencia de la transmisión iatrogénica provocada por el uso de vacunas contaminadas (Caramelli *et al.*, 2006).

4.4 Patogenia

El tiempo de incubación del Scrapie depende de la ruta de infección y la edad del animal al ser infectado, su genotipo, la cepa del agente implicado y la dosis infectiva. Existe una relación negativa entre la susceptibilidad genotípica de las ovinos y el periodo de incubación de la enfermedad (Detwiler y Baylis, 2003). La infección iatrogénica conlleva a periodos de incubación ligeramente más cortos (Caramelli *et al.*, 2006).

En el Scrapie clásico los signos clínicos se presentan usualmente entre los 2 y 5 años de edad (en promedio a los 3,5 años de edad). Aunque en ambos sexos parecen ser igualmente afectados, la manifestación de la enfermedad en los carneros ocurre a una edad ligeramente más temprana. Sin embargo, también se pueden presentar períodos de incubación más cortos y más largos que oscilan entre 1 y hasta 11 años. Es raro encontrar animales menores a 18 meses enfermos con Scrapie. Sin embargo, por lo general no es posible saber el momento de la infección en animales mayores (Detwiler y Baylis, 2003).

Como en los ovinos, el periodo de incubación en las cabras también es influenciado por el genotipo (Goldmann, 2008). La mayoría de las cabras afectadas por el Scrapie clásico tienen entre 2 y 5 años de edad. Sin embargo, también se han reportado casos hasta los 10 años (Fast y Groschup, 2013).

4.5 Patogénesis y distribución tisular de la PrP^{Sc}

Distintos estudios han establecido una hipótesis tentativa de la patogénesis del Scrapie clásico, a partir de una infección por una exposición oral al prión. Para un mejor entendimiento la patogénesis del Scrapie se puede dividir en cuatro fases fundamentales las cuales son: la infección y replicación periférica, la neuroinvasión, la neurodegeneración y la diseminación centrífuga (Farías, 2013).

El Scrapie como todas las EETs, es adquirido desde fuentes externas y son transmitidas a través de la vía oral, pero el Scrapie además de ser transmisible es contagiosa, bajo condiciones naturales (ver 4.3 Transmisibilidad) (Farías, 2013). Su infección comienza luego de la ingesta del prión por vía oral. Al ser ingerido, el PrP^{Sc} cruza la barrera de la mucosa intestinal, a través de tres vías posibles, las que no son excluyentes, estas se pueden observar en la Figura 3 (van Keulen *et al.*, 2000). La primera es a través de células-M, presentes en los folículos asociados al epitelio de la mucosa intestinal y tonsilas, encargadas de transportar macromoléculas y partículas a través del epitelio. La segunda, mediante enzimas digestivas que fragmentarían al agente en un núcleo infeccioso resistente a proteasas asociado al transporte de Ferritina. La tercera, por medio de células dendríticas que capturan antígenos por medio de sus procesos dendríticos insertos en el lumen intestinal (van Keulen *et al.*, 2000; 2008; Farías, 2013; Cifuentes, 2014). El tropismo

celular de los priones varía entre las especies y también depende de la cepa del prión, en el caso del Scrapie son linfotrópicos, debido a esto al cruzar la barrera de la mucosa intestinal, la PrP^{Sc} se propaga y se transporta con la ayuda de células al sistema linforeticular (bazo, nódulos linfáticos retrofaríngeos y mesentéricos), donde continúa su replicación aproximadamente por dos años. El momento en el cual el agente se mueve desde el sistema linforeticular hacia el cerebro no ha sido determinado en los ovinos, pero se sugiere la propagación hematogena-neuronal como una alternativa (van Keulen *et al.*, 2000; 2008; OIE, 2012; Cifuentes, 2014).

Estudios en caprinos que se encuentran en un estado clínico de la enfermedad, han entregado resultados similares a los ovinos, no encontrándose infectividad en sangre, médula ósea, fecas, riñón, glándula mamaria, leche, músculo esquelético, ovario, glándula salival, suero o útero (SAG, 2005; OMS, 2016).

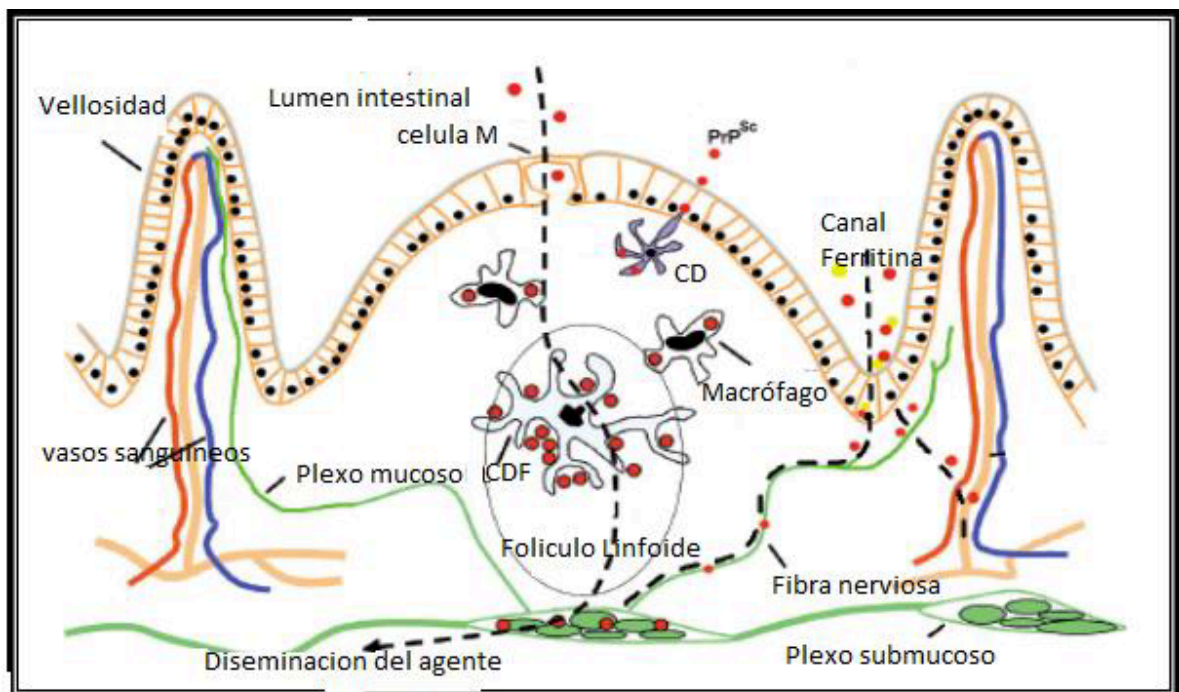


Figura 3: Posibilidades de ingreso del prión a través de la mucosa intestinal y sus posibles mecanismos de replicación (van Keulen *et al.*, 2008). CD: Célula dendrítica.

La etapa de replicación periférica del prión comienza al ingresar al organismo, primero se acumula y multiplica en los tejidos linfoides asociados a intestino (GALT), tonsilas y placas de Peyer. Posteriormente, el agente es transportado hacia los linfonódulos retrofaríngeos y mesentéricos, cuando los priones logran acceder al flujo linfoide eferente y

a la sangre se podría ocasionar una diseminación del agente a otros tejidos linfoides. Se puede detectar la PrP^{Sc} en tejidos linfoides a los 14 meses, en el SNC en cambio, se puede detectar a los 2,5 años (Farías, 2013).

Existen células que cumplen un rol fundamental en la patogenia del Scrapie, estas son las células dendríticas foliculares (CDF) y las mononucleares (principalmente macrófagos), éstas transportan la PrP^{Sc}, desde las células M en el epitelio asociado al folículo, hacia los centros germinales de los folículos linfoides (Brun *et al.*, 2003; Farías, 2013). Luego de interactuar con los linfocitos, entran en apoptosis y liberan su contenido, que puede ser fagocitado por macrófagos o infectar a las CDF, las cuales pueden difundir hacia los senos de los linfonódulos que drenan al GALT. Accediendo al flujo linfoide eferente y a la sangre, podrían ocasionar una diseminación del prión del Scrapie hacia otros tejidos linfoides (Brun *et al.*, 2003; Farías, 2013). De esta forma el prión es transportado desde el intestino hacia órganos linfoides secundarios por las CD intestinales. Estas células presentan la PrP^{Sc} a los linfocitos B y T en el tejido linfoide, como a las placas de Peyer del intestino o las CDF del bazo, timo y tonsilas (Brun *et al.*, 2003; Farías, 2013). En estos tejidos el prión se acumula y continua con la conversión de la PrP^C en la isoforma patológica, que se localiza en los centros germinales de estos tejidos linfoides (Andréoletti *et al.*, 2000; Farías, 2013).

La neuroinvasión comienza desde las terminaciones nerviosas del tejido linfoide, donde la PrP^{Sc} transmigra hacia la médula espinal y el cerebro (Andréoletti *et al.*, 2000; Farías, 2013). El primer tejido neuronal en el cual se puede encontrar la PrP^{Sc}, tanto en el Scrapie como en la EEB, es el sistema nervioso entérico (SNE) (van Keulen *et al.*, 2008; Cifuentes, 2014). La expresión de la PrP^C es totalmente necesaria para el transporte del prión desde la periferia al SNC (van Keulen *et al.*, 2008; Farías, 2013). Las ramas viscerales del Sistema Nervioso Simpático (SNS) inervan a los órganos linfoides donde se acumula el prión. También juegan un rol importante las fibras sensitivas del nervio vago, que están distribuidos por el tracto gastrointestinal y se comunican químicamente con CD activadas. Se propone como entrada al Sistema Nervioso Periférico (SNP) la zona del folículo linfoide que está inervada por fibras nerviosas desmielinizadas, ya que es en este lugar donde las CDF están en estrecho contacto con las fibras nerviosas (Everest *et al.*, 2011; Farías, 2013).

El tracto gastrointestinal está inervado por el Sistema Nervioso Entérico, donde existen sinapsis vagales eferentes en sus ganglios intrínsecos, que se extienden desde la faringe al esfínter anal, por esto existe una gran variedad de sitios y vías posibles para la neuroinvasión (Farías, 2013; Cifuentes, 2014). Al invadir el SNE, el prión tiene acceso a través de las vías neuronales eferentes parasimpáticas y simpáticas hacia el cerebro (vía ganglio mesentérico craneal/abdominal). Una vez que comienza a ascender por estas vías neuronales llega al cerebro a través del Núcleo dorsal o parasimpático del nervio vago a nivel del óxex y el Asta lateral en los segmentos medulares toraco-lumbares de la médula espinal. Cuando la PrP^{Sc} alcanza el SNC, la infección se disemina en dirección ascendente y descendente, hasta finalmente incluir la inervación completa (van Keulen *et al.*, 2008; Cifuentes, 2014).

En el caso de los caprinos la diseminación de la PrP^{Sc} durante el ascenso del prión parece ser bastante similar al del Scrapie clásico en ovinos (EFSA, 2009). Sin embargo, también se ha demostrado que el curso puede ser más prolongado en comparación con el de los ovinos. En las crías de caprinos infectadas cerca del nacimiento, la PrP^{Sc} es detectable en el GALT desde los 4 meses de edad, en el tejido linfoide periférico después de los 6 meses de edad y en el SNC las primeras acumulaciones de la PrP^{Sc} se dan a los 18 meses de edad. En el músculo esquelético a los 21 meses de edad (EFSA, 2009). Sin embargo la interacción con un tipo particular del genotipo del hospedero puede resultar en diferentes dinámicas de diseminación (EFSA, 2009).

El efecto de los priones se ejerce exclusivamente en el SNC, sin producir respuesta en el hospedero. El prión no es directamente tóxico, la neurodegeneración se produce sólo en tejidos donde se expresa la PrP^C, los tejidos donde ésta no se expresa pueden acumular la PrP^{Sc} y aún así permanecer sanos (Prusiner, 1998; Farías, 2013). Se identifican dos fases en la etapa neurodegenerativa: la primera tiene un requerimiento obligado de la expresión de PrP^C, para que ocurran los cambios conformacionales que origina la PrP^{Sc}, que se agrega formando el amiloide. En la segunda, estos cambios se traducen en daño neuronal y la consecuente disfunción fisiológica del SNC (Farías, 2013).

Debido a que las EETs se diseminan centrípetamente hacia el cerebro y centrífugamente desde el cerebro y la médula espinal a través de los nervios periféricos, se sugiere que pueden también propagarse hacia otros tejidos blancos. La alimentación humana

comprende distintos tejidos de animales que se ven afectados por las EETs, como bovinos, ovinos, caprinos, entre otros constituyendo un componente importante de examinación buscando la presencia de priones. Así, se ha descrito la presencia de depósito de PrP^{Sc} en una variedad de músculos incluyendo la lengua, en ratones inoculados intracerebralmente, en hámsteres infectados oralmente y en ovinos enfermos, incluso antes del comienzo de los signos clínicos del Scrapie (Jeffrey *et al.*, 2006; Farías, 2013). En el primer estudio publicado en el 2004, se encontraron acumulaciones de PrP^{Sc} en el tejido muscular de ovejas, infectadas naturalmente y en desafiadas oralmente, tanto en la fase preclínica como clínica de la infección (Farías, 2013). Se postula una diseminación centrífuga desde las neuronas motoras espinales y/o craneales, a través de sus proyecciones eferentes hacia las uniones neuromusculares y desde aquí, postsinápticamente dentro de las fibras musculares, donde las sensitivas nerviosas pueden proveer una vía adicional para la infección (Everest *et al.*, 2011; Farías, 2013).

4.6 Signos Clínicos

Los signos clínicos son muy variables en las distintas razas, rebaños, regiones y países y son influenciados por el genotipo, la cadena del agente y la etapa de la enfermedad (Ulvund, 2008).

Mayoritariamente la fase clínica progresa lentamente entre semanas a meses, existen casos donde se han observado inicios agudos de la enfermedad, como también duraciones de hasta un año con remisión intermitente de los signos; muertes repentinas de los animales (OIE, 2013a;b). El escaso reconocimiento de la enfermedad se debe a la aparición sutil de variables signos clínicos, como también la progresión lenta de la enfermedad, son las razones del porqué la enfermedad hace difícil la caracterización de los signos clínicos desde un comienzo (Ulvund, 2008).

El aislamiento de los mismos animales de los rebaños es comúnmente el primer signo clínico. Aquellos más específicos en una etapa temprana de la enfermedad son deficiencias del SNC y pérdida de la lana causada por el prurito. Los animales afectados pueden parecer normales, pero son estimulados por el estrés (ruido repentino, movimiento excesivo y

manejos), generando temblores evidenciables. En etapas más tardías, el animal hasta puede caer en un estado convulsivo (OIE, 2013a;b).

Los signos clínicos del Scrapie pueden ser clasificados en cinco categorías (Ulvund 2008):

- Generales: depresión, pérdida de lana o pelo, regurgitación y arritmia cardíaca.
- Del comportamiento: temblor de la cabeza, estado mental alterado, respuesta con mordisqueo (reflejo), bruxismo, posición anormal de la cabeza, hiperexcitabilidad, ansiedad, aprehensión, salivación, agresividad y rechazo a ser ordeñados.
- De sensibilidad: prurito, canibalismo, alotrofagia y mordidas, hiperestesia.
- De locomoción: ataxia en las extremidades posteriores, dismetría, postura anormal, miembros posteriores débiles y dar vueltas.
- Misceláneos: pérdida de peso, edema labial, discapacidad visual, breves ataques epileptiformes e hipogalaxia.

No todos los síntomas están siempre presentes, pero usualmente por lo menos se presenta más de uno (Hörnlmann *et al.*, 2006). Por otra parte, la forma nerviosa puede dominar en un rebaño, mientras que en otros será la forma prurítica (Ulvund, 2008).

En general, los signos más reportados son el temblor de la cabeza, respuesta con mordisqueo, hiperexcitabilidad, salivación, prurito y la pérdida de peso, en los diferentes rebaños y países. Las etapas finales son caracterizadas por una pérdida masiva de peso a menudo sin cambios del apetito y la postración debido a la ataxia severa (Hörnlmann *et al.*, 2006; Ulvund, 2007). La duración de la enfermedad va desde 1 a 3 meses (Ulvund, 2008).

Los signos clínicos descritos anteriormente, en combinación o solos, no son patognomónicos para Scrapie, por lo tanto, el diagnóstico clínico debe ser confirmado a través de investigaciones de laboratorio (Ulvund, 2007).

4.7 Diagnóstico

La vigilancia en países que presentan enfermedades espongiformes transmisibles en los pequeños rumiantes está basada en test rápidos usando tejido del tronco encefálico. En el caso de que existan resultados positivos en uno de los test rápidos, todas las muestras deben ser ratificadas en un laboratorio de referencia nacional usando uno de los métodos

confirmatorios aprobados por la OIE (Matthews *et al.*, 2004). Estos métodos son la histopatología, inmunohistoquímica (IHQ), microscopio electrónico e *immunoblot* de SAF. Por razones prácticas, mayoritariamente la IHQ y el *Immunoblot* de SAF tienen relevancia hoy en día (Ryder *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 2004).

4.7.1 Histopatología

En el Scrapie clásico no se han descrito lesiones macroscópicas aparentes visibles y las alteraciones histomorfológicas están, en su gran mayoría, localizadas en el sistema nervioso central. La primera descripción de las lesiones producidas por el Scrapie clásico proviene del siglo XIX (Besnoit y Morel, 1898). Es una enfermedad neurodegenerativa con vacuolaciones en la materia gris como característica principal, frecuentemente acompañada con astrocitosis pero sin signos de inflamación. La pérdida neuronal está presente, pero no es significativamente evidente en los exámenes de rutina (Jeffrey y González, 2004). El desarrollo de los signos clínicos no son necesariamente reflejados con la severidad de los cambios patológicos (Ryder *et al.*, 2001; Jeffrey y González, 2004).

Las lesiones del SNC son usualmente bilaterales y simétricas (Fast y Groschup, 2013), especialmente en el tronco encefálico. Los sitios comúnmente afectados son el óbex y núcleo parasimpático del nervio vago (Sisó *et al.*, 2010). Sin embargo, es evidente una variación de la distribución neuroanatómica de las lesiones espongiiformes, especialmente en las áreas más rostrales del cerebro. La formación de las lesiones no sólo depende de la cepa del prión, sino que también del genotipo de hospedero, su raza y presumiblemente otros factores individuales, adicionalmente la magnitud de la vacuolización es influenciada por la edad en que se presenta la enfermedad clínica (Sisó *et al.*, 2010).

En el Scrapie clásico las vacuolaciones son detectables en el pericarion neuronal y en el neuropilo, pero puede ser extraño en algunos casos naturales o experimentales. Estas vacuolas unidas a la membrana son encontradas dentro del pericarion neuronal como única o múltiples vacuolas distendidas en el cuerpo celular, y/o dentro del proceso que lidera a la aparición del proceso espongiiforme típico en la materia gris del neuropilo (Jeffrey y González, 2004). La proporción de la vacuolización del pericarion al neuropilo difiere respecto a la enfermedad y a la cepa del agente. (Sisó *et al.*, 2010).

En modelos murinos de Scrapie, las dendritas son las más frecuentemente afectadas, el pericarion neuronal, los axones y los terminales axónicos se afectan en un menor grado. Además podrían presentar degeneración neuronal como la cromatolisis, neurofagia y las neuronas encogidas y oscuras. Otro hallazgo que es inconsistente y sólo se encuentra en algunos casos es la astrocitosis (Wood *et al.*, 1997; Jeffrey *et al.*, 2006).

En el Scrapie atípico, las vacuolaciones son más prominentes en la capa molecular de la corteza cerebelar, en la neocorteza del hipocampo, en los núcleos basales y núcleo *accumbens*. El tronco encefálico es, en contraste con el clásico, afectado en un grado mucho menor y no se observan lesiones a nivel de óbex (Benestad *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005). La vacuolación intraneuronal no está presente (Moore *et al.*, 2005) o son infrecuentemente vistas (Benestad *et al.*, 2003).

4.7.2 Inmunohistoquímica

El segundo marcador de las EETs es la acumulación de la PrP^{Sc} en el cerebro, el cual precede a las alteraciones morfológicas (Fariás, 2013). Estudios previos (van Keulen *et al.*, 2000) demostraron que el tronco encefálico a nivel del óbex, particularmente el núcleo parasimpático del nervio vago, es la primera área del SNC en estar afectada antes de cualquier alteración morfológica. Con la progresión de la enfermedad, la acumulación del PrP^{Sc} se expande y se propaga en direcciones ascendentes y descendentes hasta finalmente involucrar completamente el neuroeje (Ryder *et al.*, 2001; Jeffrey *et al.*, 2006; Fariás, 2013).

Es posible diferenciar muchos tipos morfológicos de la acumulación de PrP^{Sc}. Estos perfiles proporcionan información específica de la cepa y procedencia de los tipos celulares que sostienen la infección (tropismo celular) y el procesamiento celular del PrP^{Sc}. No todos los tipos y patrones son encontrados en todos los casos de Scrapie. Además, en la IHQ es posible una diferenciación entre algunos EET ovinos y caprinos (incluyendo ovino/caprino EEB), usando la inmunoreactividad de anticuerpos de reconocimiento de diferentes epítomos de PrP^{Sc} (mapeo). Este método se basa en los diferentes sitios de anclaje del PrP^{Sc} en los distintos tipos celulares. Ambas aproximaciones permiten la definición del fenotipo inmunohistoquímico, y la subsecuente identificación del hospedador y de la cepa del prión (Ryder *et al.*, 2001; Jeffrey *et al.*, 2006; Jeffrey y González, 2007).

4.8 Diagnóstico diferencial

A pesar de que los signos del Scrapie son distintivos en estados iniciales de la enfermedad, pueden ser confundidos con otras patologías como: Ectoparásitos, Enfermedad de Aujeszky, Rabia, Listeriosis, Maedi-Visna, Toxemia de preñez, Plantas tóxicas y químicos e hipomagnesemia (OIE, 2012; 2013a).

5. Epidemiología

El Scrapie es endémico en la mayoría de los estados de la Unión Europea (UE), como también lo es en Noruega, Islandia y Suiza. Brasil, Canadá, Israel, Japón, Palestina, Rusia, Tayikistán, y en EEUU han sido reportados casos de Scrapie atípico y/o clásico en los últimos 6 años (OIE, 2016d; OMS, 2016). Sólo casos individuales de Scrapie atípico fueron documentados en las Islas Malvinas y Nueva Zelanda (Epstein y Beecher, 2005; Kittelberger *et al.*, 2010). De acuerdo al “Atlas Mundial de Enfermedades del Ganado 2011” el Scrapie está en el octavo puesto del *ranking* mundial de las causas de pérdida de ovinos y caprinos, de un total de 676 enfermedades en estudio (World Bank, 2011).

En distintas fechas en países como Australia y Nueva Zelanda (1952-1954), Sudáfrica (1964-1972), Colombia (1968-1971) y a Kenia (1970), se sospechó de una introducción de Scrapie clásico desde el Reino Unido. Luego de una exhaustiva erradicación por medio del sacrificio de los ovinos importados y con los que compartían el rebaño, Australia y Nueva Zelanda se han mantenido libres hasta la fecha (Detwiler y Baylis, 2003; Cifuentes, 2014).

La verdadera situación de la enfermedad en muchos países aún es desconocida, debido a que usualmente existe un inadecuado sistema de vigilancia pasiva para detectar a los animales afectados. Se debe establecer un sistema de vigilancia activo para poder reconocer el estado de libertad de la infección, que incluye la examinación de todos los animales que han muerto en el rebaño y que han sido eutanasiados por emergencia (Detwiler y Baylis, 2003; OIE, 2016d). Esto es ejemplificado por la introducción de un programa de vigilancia activo concertado para Scrapie en ovinos y caprinos a lo largo de toda la UE el 2003. En este contexto, se examinaron para EETs todos los animales mayores a 18 meses de edad (muertos, eutanasiados de emergencia, como también sanos eutanasiados) (Detwiler y Baylis, 2003; Cifuentes, 2014).

5.1 Salud pública

El principal problema evidenciado de las EETs en la salud pública fue al establecerse el nexo entre la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ^{nv}) y el prión de la EEB, debido a la exposición de humanos a alimentos contaminados con el prión (Brown y Mastrianni, 2010; Moda *et al.*, 2013; Priola, 2013). En este caso, a pesar de la barrera interespecie, el inicio de la EEB en los bovinos se ha atribuido originalmente a la utilización de harinas cárnicas con contenido de proteínas de ovinos infectadas de Scrapie (Moda *et al.*, 2013; Priola, 2013). Además, una vez que es superada la barrera interespecie, la infectividad transcurre al ritmo normal de la nueva especie y también puede ser provocado por la contaminación de harinas cárnicas de origen bovino (Rey-Gayo y Calbo, 2002; Priola, 2013).

En el caso del Scrapie aún no se ha evidenciado contagio humano por el consumo de productos de las especies afectadas, pero debido a las nuevas investigaciones y las cepas encontradas de PrP^{Sc} no se descarta esta posibilidad, por lo que estas nuevas variantes sí pueden presentar un peligro para la salud humana (Vaccari *et al.*, 2009). En la medida que se han mejorado las técnicas moleculares de diagnóstico y caracterización de los priones, han aparecido nuevas cepas de Scrapie, clasificándose como clásicas, atípicas y tipo EEB, de las cuales se desconoce el potencial peligro que pudieran representar al ingresar a los alimentos (Juste *et al.*, 2012; Farías, 2013; Cifuentes, 2014).

Se sugiere que los pequeños rumiantes actúan como reservorio de PrP^{Sc}, sugiriendo el posible rol de éstos como promotores de agentes de las EETs con la habilidad para traspasar la barrera interespecie (Moda *et al.*, 2013; Priola, 2013).

Estudios de laboratorio indican que el prión de la EEB, incrementa su virulencia y capacidad de atravesar la barrera interespecie al realizar pasajes en la especie ovina (Espinosa *et al.*, 2007; Tamgüney *et al.*, 2009). Además, se demostró que estirpes atípicas de Scrapie pueden ser transmitidas oralmente entre ovinos (Jeffrey y González, 2007; van Keulen *et al.*, 2008). Interpretaciones más sensibles de pruebas diagnósticas de rutina, han indicado la presencia de PrP^{Sc} en tejido presumiblemente no infectado como el hígado (Everest *et al.*, 2011). Esto sugiere la presencia de proteínas priónicas potencialmente

patógenas en la población ovina y caprina que pueden llegar directamente a la cadena alimenticia humana (Juste *et al.*, 2012).

La transmisión de los priones, como se ha descrito anteriormente, se realiza a través de la ingestión de productos contaminados con la PrP^{Sc}, que alcanza una mayor concentración en los productos considerados como Material Específico de Riesgo (MER) (EFSA, 2013). Por esto, se considera como MER si proceden de animales originarios de un Estado miembro o un tercer país, o de una de sus regiones, con un riesgo controlado o indeterminado de EEB.

En bovinos, se consideran como MER:

- i) el cráneo, excluida la mandíbula e incluidos el cerebro y los ojos, y la médula espinal de los animales mayores de 12 meses,
- ii) la columna vertebral, excluidas las vértebras de la cola, las apófisis espinosas y transversas de las vértebras cervicales, torácicas y lumbares, la cresta sacra media y las alas del sacro, pero incluidos los ganglios de la raíz dorsal, de los animales mayores de 30 meses, y
- iii) las amígdalas, los últimos 4 metros del intestino delgado, el ciego y el mesenterio de los animales de todas las edades;

En caprinos y ovinos:

- i) el cráneo, incluidos el cerebro y los ojos, las amígdalas y la médula espinal de los animales de más de 12 meses o en cuya encía haya hecho erupción un incisivo definitivo, y
- ii) el bazo y el íleon de los animales de todas las edades (EFSA, 2013).

Dentro de éstos no se encuentra la leche, ni el músculo. Sin embargo, se ha publicado que existen en los comercios, leche homogeneizada y pasteurizada que contienen la proteína priónica patógena (Carrión, 2007; EFSA, 2013).

El análisis molecular, que incluye el perfil de bandas y el patrón de glicosilación; los prolongados periodos de incubación, que en humanos puede superar los 50 años; el propio efecto genético sobre las barreras de transmisión y la potencial transmisibilidad del prión de la EEB a otras especies, son algunos de los argumentos utilizados a favor de la hipótesis y que inducen a la cautela (Pastrana, 2008; Cifuentes, 2014).

En todos los casos reportados de la ECJ^v, se detectó la presencia de la PrP^{Sc} en los órganos linfoides de los pacientes enfermos (Lasmezas, 2003; Collins *et al.*, 2004). También se encontró la PrP^{Sc} presente en otros órganos donde se detectaron menores concentraciones como el recto, timo y glándulas adrenales en uno de los pacientes estudiados (Collins *et al.*, 2004; Cifuentes, 2014). En el año 2003, se presentó el primer caso de muerte de un paciente con ECJ^v, por una transfusión de sangre desde un donador con esta enfermedad. Esto plantea la posibilidad de transmisión del prión por vía sanguínea entre humanos afectados con ECJ^v, aunque no hay estudios sobre esta posibilidad (Llewelyn *et al.*, 2004).

5.2 Situación Nacional

En el caso de Chile, para evitar el riesgo de ingreso de la enfermedad al país, se adoptan las medidas recomendadas por la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (FAO, 2003; OIE, 2013a, 2016b;c; OMS, 2016). El organismo regulador para Chile es el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) que en 1990, prohibió la importación al país de animales, productos y subproductos bovinos, ovinos y caprinos de riesgo de países con EEB (Mencionados en el punto 5.1), donde no se consideran prohibidos la leche y sus derivados, la lactosa, el semen, las pieles y cueros, las gelatinas y el colágeno preparado con pieles y cueros (Núñez, 2004; Cifuentes, 2014).

La EEB y el Scrapie están consideradas como enfermedades de notificación obligatoria, por lo que los médicos veterinarios privados deben notificar los cuadros clínicos compatibles al SAG (Núñez, 2004; SAG, 2015). En el caso de los bovinos, se definió como caso compatible aquel animal mayor a 30 meses que manifestase signología nerviosa progresiva; caso sospechoso aquel animal mayor a 30 meses en el caso de bovinos y 18 meses para ovinos y caprinos, que cursen con signología neurológica progresiva y que resulte positivo a las pruebas rápidas; y caso confirmado si se determina positivo a la técnica de IHQ realizada en óbex (SAG, 2007).

En la búsqueda de la presencia de la PrP^{Sc}, en el país, se colectaron muestras entre 1996 y 1998, de cerebro de bovinos, ovinos y caprinos desde todo el país, para realizar diagnóstico histopatológico de las EETs, de acuerdo a los procedimientos indicados por la OIE,

resultando negativas a Scrapie y a EEB (Núñez, 2004; Cifuentes, 2014). El 2000, se prohibió la formulación, elaboración, distribución, venta y uso de alimentos y suplementos que contengan proteínas de origen rumiante para la alimentación de estos mismos (Núñez, 2004; Cifuentes, 2014). El 2001, se incorpora al reglamento de las industrias productoras de Harina de Carne y Hueso, el realizar los procesos a una temperatura de 133°C por 20 minutos mínimo a una presión de 3 bares. Además, se exige el mismo proceso de elaboración para la importación de estas harinas de rumiantes (Núñez, 2004; SAG, 2007; Cifuentes, 2014).

El SAG ha mantenido un Programa de Vigilancia Activa y Pasiva para las distintas EETs por el aumento de países con casos nativos de éstas en Europa, adoptando nuevas medidas de prevención (SAG, 2007). De este modo, el 2001, se estableció que sólo podrán internarse al país bovinos y sus productos desde Argentina, Australia, Brasil, Estados Unidos, Nueva Zelandia, Canadá, Paraguay y Uruguay y que no fue aplicable a: leche y sus productos bovinos, semen, sebo libre de proteínas, pieles y cueros, gelatina y colágeno. Esta restricción se vio modificada en tres ocasiones, dos el 2003 y una 2012, debido a la notificación de casos de EEB en Canadá, EEUU y Brasil, respectivamente, por lo que se suspendió la internación de bovinos y productos de origen bovino desde estos países. La reapertura con Brasil fue el 2013 al asegurarse que fue un caso aislado y de presentación atípica (Cifuentes, 2014; SAG, 2014). El año 2001 además de la utilización de las técnicas de Histopatología para la detección de EETs, se adicionó al diagnóstico la técnica de Inmunohistoquímica, para la vigilancia activa y pasiva anual (Núñez, 2004).

En el caso del Scrapie, en el país, es una enfermedad de notificación obligatoria (SAG, 2007; 2015). Debido a que nunca ha sido descrita la enfermedad, la vigilancia, previo al año 2015, para la enfermedad era pasiva en el caso de ovinos y caprinos, además, la denuncia de los casos de sospecha estaban especificados en base a los descritos para la EEB por la autoridad sanitaria pertinente (Núñez, 2004; SAG, 2007; 2015).

Actualmente, si se comparan los planes anuales de vigilancia de enfermedades, en el caso del Scrapie, entre los años 2016 y 2017 se pueden evidenciar los esfuerzos por aumentar la vigilancia para la enfermedad, los cambios que se pueden observar están graficados en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3: Comparación entre el plan anual de vigilancia de enfermedades 2016 y 2017, del SAG.

Vigilancia basada en el riesgo de animales susceptibles	2016	2017
Objetivos		Vigilancia basada en riesgo de animales susceptibles
Alcance	Predios ovinos Regiones de O'Higgins a Magallanes	Predios ovinos y caprinos de Regiones de Arica y Parinacota a Magallanes
Especies	Ovinos adultos (ovejas y carneros)	Ovinos y Caprinos mayores de 18 meses
Unidades Epidemiológicas	Cabañas de ovinos	Cabañas de ovinos
Marco de Muestreo	Cabañas de ovinos	Cabañas de ovinos
Tipo de Muestreo	Muestreo dirigido a todos los ovinos con signos clínicos compatibles con Scrapie detectados en predios, según lo indicado en orientaciones generales del muestreo	Muestreo dirigido a todos los ovinos y caprinos mayores de 18 meses, con signos clínicos compatibles con Scrapie detectados en predios, según lo indicado en orientaciones generales del muestreo
Unidad de Muestreo	Unidades epidemiológicas definidas previamente	Ovinos y caprinos mayores de 18 meses dentro de los rebalis animales a muestrear
Frecuencia de Muestro	No se puede determinar debido a las características de los animales a muestrear	No se puede determinar debido a las características de los animales a muestrear
Tamaño de la Muestra	99 muestras	438 muestras
Nivel de Prevalencia	3%	2%
Nivel de Confianza	95%	95%
Error		5%
Muestras a Colectar	Encéfalo	Óbex congelado para la prueba rápida y Encéfalo que incluye tronco encefálico (en solución de formalina 10%) para histopatología (tinción H/E) e IHQ
Prueba de Laboratorio	ELISA	Tamiz: ELISA Histopatología en animales con signos compatibles En caso de sospechosos o positivos a la prueba de tamiz se realizará IHQ

(SAG, 2016; 2017)

Al analizar las diferencias de los planes anuales de vigilancia, se puede desprender que el SAG ha aumentado la vigilancia principalmente en la especie ovina, pero también ha incluido paulatinamente a la especie caprina, por lo tanto hoy en día la vigilancia para la especie ovina en el caso del Scrapie es pasiva y activa (SAG, 2016; 2017), pero aún sigue siendo pasiva en el caso de los caprinos. Lo que aún mantiene con escaso conocimiento respecto a la especie caprina, a diferencia de lo que ocurre con los ovinos, en la que es levemente mayor por la relevancia económica de exportación que representa esta última especie para Chile (Núñez, 2004; Cifuentes, 2014).

Cabe destacar que la masa ganadera caprina contabilizada según censo agropecuario, indicó aproximadamente 705.527 cabezas de ganado caprino en nuestro territorio nacional (INE, 2010). Tomando en cuenta que la mayor parte de la masa caprina del país está en manos del sector socioeconómico más humilde, pequeños productores; quienes comercializan principalmente sus productos cárnicos y lácteos en el mercado informal (INE, 2010). Por lo expuesto anteriormente, actualmente Chile no tiene un estatus sanitario declarado para el Scrapie, si bien se han implementado variadas medidas para disminuir al máximo del riesgo la introducción de alguna EETs, aún es escasa la vigilancia para esta especie (SAG, 2014).

Actualmente Chile se encuentra categorizado por la Unión Europea como de riesgo insignificante de presentar un caso de EEB. Estudios de evaluación del riesgo geográfico de EEB en Chile, reconocidos por la Comisión Técnica de la Unión Europea, determinaron para nuestro país el Nivel I, siendo altamente improbable la presencia del prión en el territorio Nacional (SAG, 2014; OIE, 2016a).

Así Chile se integra en un grupo de 46 países que han alcanzado la categoría más alta, en su condición sanitaria de la enfermedad, que la normativa internacional en sanidad animal otorga a los países miembros de la OIE (SAG, 2014). Si bien se han implementado variadas medidas para disminuir al máximo el riesgo de introducción de alguna EETs en nuestro país, es poco lo que se ha vigilado al respecto en los últimos años; puntualmente con la especie caprina. Por lo tanto, este trabajo pretende contribuir a la vigilancia pasiva anual que realiza el organismo gubernamental para esta especie. En base a lo descrito anteriormente es que en esta memoria de título se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la vigilancia de Scrapie clásico en Chile a través de la aplicación de la técnica de Inmunohistoquímica en óbex de caprinos *post mortem*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la aptitud de la muestra de tejido nervioso caprino a través de la tinción de Hematoxilina Eosina (H/E).
2. Describir diferentes lesiones histopatológicas encontradas en las muestras procesadas con la técnica de Hematoxilina Eosina (H/E).
3. Aplicar el método de inmunohistoquímica en óbex de caprinos *post mortem*, para detectar proteínas priónicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se utilizaron 50 muestras de óbex caprino, obtenidas de animales sacrificados en mataderos de la IV Región ubicados en la Zona Norte-Centro del país, provenientes de 50 animales mayores de 2 años de edad sin importar raza ni sexo.

Las muestras se obtuvieron a través del procedimiento para la extracción de encéfalo, el que se realizó separando la cabeza del cuerpo mediante un corte a través de la articulación atlanto-occipital. Luego se realizó una incisión en la piel para exponer el cráneo, órbitas y parte posterior de la nariz, removiendo los músculos y la grasa del área para facilitar los cortes posteriores. Con una sierra se cortó transversalmente la cabeza (huesos frontales) a nivel de la parte posterior de cada órbita. Se efectuaron tres cortes: uno transverso entre los surcos supraorbitarios y otro a cada lado del cráneo en el hueso frontal desde el foramen magno, en un ángulo aproximadamente 45 grados respecto al eje vertical (Figura 4a). Luego se extrajo lentamente la calota, teniendo la precaución de evitar desgarros en los anexos o fijaciones (meninges). Así se visualizó la duramadre la cual se cortó longitudinalmente y se rechazó para visualizar la masa encefálica (SAG, 2005; OIE, 2012).

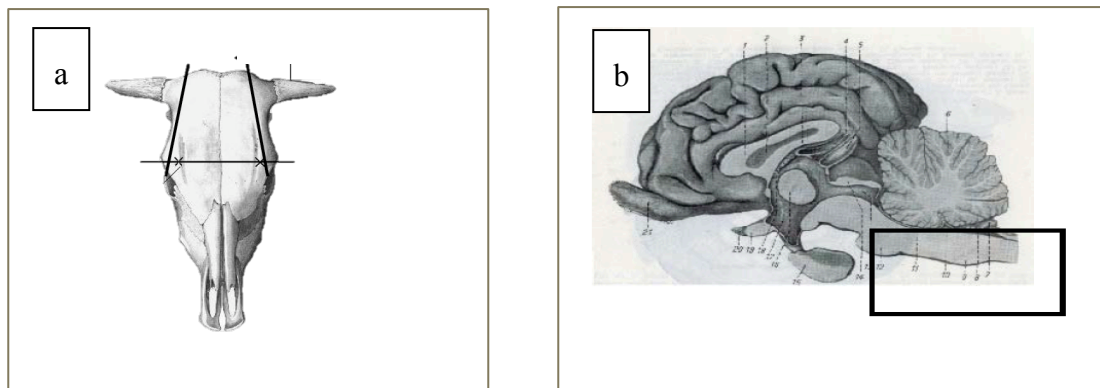


Figura 4: **a)** Esquema de un corte transversal del cráneo para la extracción de cerebro bovino (similar al proceso de extracción en los caprinos). **b)** Esquema que señala la médula oblongada, zona que contiene el óbex (recuadro) (SAG, 2005).

Una vez obtenidos los encéfalos se removió el cerebelo, para luego depositarlos en una solución tamponada de formalina al 10%, para su fijación. La muestra utilizada se obtuvo realizando un corte transversal, de aproximadamente 4 mm de grosor, en el sitio anatómico de interés, que corresponde al óbex (Figura 4b; 5). El óbex es una estructura impar y transversal situada en el extremo caudal del techo del cuarto ventrículo y que cierra el surco mediano de la médula oblongada (Figura 4b) (Schaller, 1996; SAG, 2005; OIE, 2012), este lugar es seleccionado debido a que contiene los núcleos nerviosos donde se depositan los priones (Figura 5) (SAG, 2005; OIE, 2012).

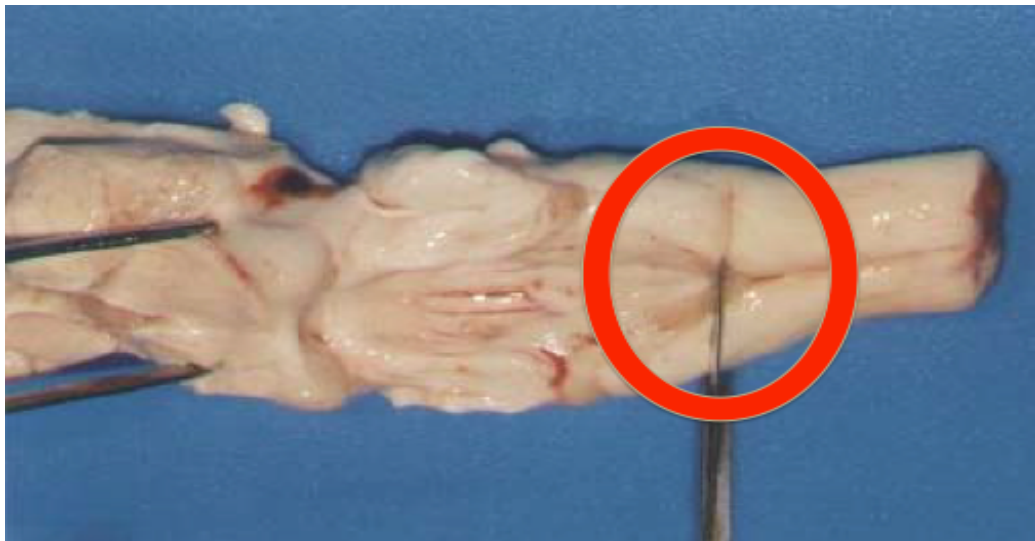


Figura 5: Vista dorsal del tronco encefálico, mostrando el corte a nivel de óbex (círculo) (SAG, 2005).

Las muestras de óbex fueron procesadas y analizadas en la Unidad de Patología del Departamento Laboratorio y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria, del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG). Este laboratorio cuenta con un nivel de bioseguridad 2 (BSL-2), o nivel básico 2. Las prácticas, los equipos, el diseño y la construcción de instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2 son aplicables a laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos u otros laboratorios, donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes en la comunidad y que están asociados con enfermedad humana de variada gravedad (SAG, 2005; OIE, 2016d).

Las muestras fueron depositadas en *cassetes* histológicos para su procesamiento (Anexo 1) y su inclusión en bloques de parafina utilizando un centro de inclusión (Leica EG1160). En

este centro se sometieron a deshidratación y aclaramiento en un procesador de tejidos automáticos, que sumerge las muestras en alcoholes de graduación ascendentes, xilol, y luego parafina secuencialmente demorando 16 horas en completar su operación. De cada bloque se obtuvieron cortes seriados de 5µm de espesor utilizando un micrótopo (Leica RM2145), los que fueron montados en dos portaobjetos: uno destinado para la tinción de Hematoxilina-Eosina (H/E) para el análisis histopatológico y el otro, para realizar la técnica de IHQ (SAG, 2005; Cifuentes, 2014).

Hematoxilina - Eosina (H/E)

El fundamento de la tinción de hematoxilina-eosina (H/E) consiste en la tinción del núcleo celular por parte de la hematoxilina y del citoplasma por parte de la eosina, posterior a la rehidratación de los tejidos (Anexo 2), para el estudio histopatológico de las muestras, la cual se realizó en un equipo automático (Leica Autostainer XL) (Anexo 3)(Gavier-Widen *et al.*, 2005; SAG, 2005). Con esta técnica se pudo comprobar la aptitud de la muestra evaluada (Anexo 4) a partir de la observación de la integridad de los siguientes núcleos nerviosos de presentación bilateral: el del tracto solitario, el parasimpático del nervio vago, el del tracto espinal del nervio trigémino y el motor del hipogloso (Schaller, 1996; SAG, 2005), al observar estos núcleos la muestra fue clasificada como apta. Por otra parte, se realizó un estudio histopatológico de las muestras para describir diferentes lesiones histopatológicas, como por ejemplo inflamatorias, hemorrágicas, pigmentarias, vacuolares, que fueran sugerentes de otras patologías diferenciales (Gavier-Widen *et al.*, 2005; SAG, 2005).

Inmunohistoquímica (IHQ)

Para realizar la prueba de IHQ las láminas seleccionadas como aptas fueron montadas en un portaobjeto *Probe On Plus*. Se desparafinaron y rehidrataron (Anexo 5) sometiéndolas a baños en xilol y alcoholes de graduación descendentes. Después, se inhibió la actividad endógena de la Peroxidasa presente en el tejido. Para ello, las muestras se mantuvieron en una solución de agua oxigenada al 3% en metanol absoluto durante 10 min. Luego, se sumergieron en agua bidestilada y fueron incubadas en ácido fórmico al 98% durante 5 min. a temperatura ambiente, se lavaron y neutralizaron en una solución tampón Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,6 por 2 min., esto se repitió tres veces. Posteriormente, fueron transferidas a

una solución recuperadora de antígenos pH 7,6 (*Target Retrieval Solution*®), e incubadas en un autoclave durante 20 min. a 120°C. El enfriamiento se realizó en la misma solución a temperatura ambiente y luego incubadas en una solución de Tampón Tris Salino-Tween 20 (TBST) pH 7,6 por 10 min (Manning *et al.*, 2008; Cifuentes, 2014).

La aplicación de los reactivos se efectuó mediante el uso de capilaridad. Los portaobjetos fueron montados en un sostenedor de portaobjetos (*Slide Holder*), siguiendo el protocolo del *kit* Pullman (Monoclonal F99/97.6.1). Para esto, se agregaron en los pocillos de un dosificador (Isolon®), 150 µl de solución de proteinasa K para las muestras contenidas en el *Slide Holder* y se incubaron por 90 seg. a temperatura ambiente, seguidos de tres lavados con TBST pH 7,6. Posteriormente, se agregaron 150 µl del anticuerpo primario monoclonal F99/97.6.1 en una dilución 1:1000, incubando las muestras por 20 min. a 37°C, seguida de tres lavados con TBST pH 7,6. Luego, se incubaron con 150 µl del anticuerpo secundario policlonal anti-ratón biotinilado por 15 min. a 37°C; acto seguido se adicionaron 150 µl de la Streptavidina – *horseradish peroxidase* (HRP) y se dejó incubar por 10 min (Manning *et al.*, 2008; Cifuentes, 2014).

Se aplicó el revelador de la reacción inmunológica mediante la incubación protegida de la luz directa con 150 µl de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) durante 5 min. Para poder visualizar mejor la reacción, las muestras se sometieron a tinción con Hematoxilina de Mayer por 10 min para contrastar con el tejido adyacente. Finalmente, cada muestra se comparó con los controles, positivos y negativos, aportados por el laboratorio de referencia canadiense (*Nacional Reference Laboratory for Scrapie and CWD, Animal Research Institute, Canadian Food Inspection Agency*).

RESULTADOS

Se presentarán de acuerdo a la obtención de los objetivos planteados:

Evaluar la aptitud de la muestra de tejido nervioso caprino a través de la tinción de Hematoxilina Eosina (H/E).

Evaluación de aptitud de las muestras

La totalidad de las muestras de óbex de caprinos obtenidas de mataderos de la IV Región del país, para este estudio, se analizaron mediante la técnica de H/E permitiendo su confirmación como aptas o no aptas. Para esto fue necesaria la observación de estructuras pares, bilaterales a nivel de óbex en los cortes seleccionados. Una vez procesados y teñidos, los cortes con la tinción de H/E fueron observados en un microscopio óptico (Nikon Hfx-Dx), para examinar las estructuras presentes de acuerdo al esquema descrito en la Figura 6a, en la cual a manera de ejemplo se presenta además una microfotografía de las muestras clasificadas como aptas en la Figura 6b.

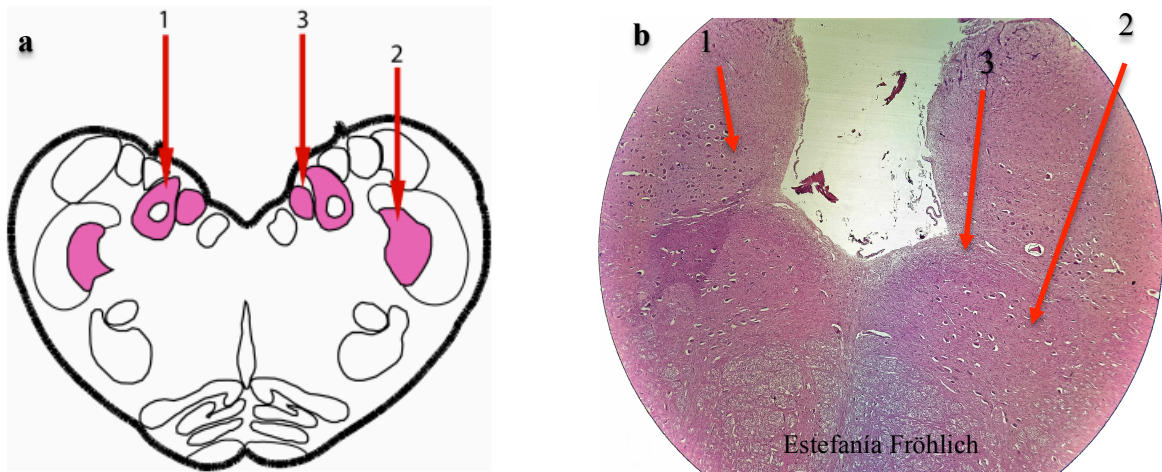


Figura 6: a) Esquema anatómico: de óbex y principales núcleos que deberían ser observados en una muestra apta. **b) Microfotografía (10x):** Sección transversal a nivel del óbex, de una muestra apta, donde se identifican los sitios claves para el diagnóstico por histopatología e inmunohistoquímica. (Flechas) **1.** Núcleo del tracto solitario. **2.** Núcleo del tracto espinal del nervio trigémino. **3.** Núcleo parasimpático del nervio vago (SAG, 2005; OIE, 2012).

Cada una de las muestras de óbex de los 50 animales estudiados, de los cuales se obtuvieron un total de 50 cortes que fueron analizados histológicamente, fueron considerados como aptos para realizar el análisis histopatológico y el posterior diagnóstico realizado con el protocolo de IHQ.

Describir diferentes lesiones histopatológicas, encontradas en las muestras procesadas con la técnica de Hematoxilina Eosina (H/E).

Análisis histopatológico de las muestras de óbex en caprinos (H/E):

Para el análisis histopatológico de los cortes de óbex se utilizó la tinción H/E modificada para EETs, donde las muestras aptas fueron observadas en un microscopio óptico lo que permitió visualizar algunas lesiones histopatológicas, las que se describieron en algunos de los cortes de óbex estudiados, los cuales fueron comparados con los controles positivos y negativos.

Las principales alteraciones histopatológicas que se pudieron observar en las muestras correspondieron a: hemorragia focal, infiltrado perivascular y pigmentos, pero no se encontraron lesiones sugerentes o compatibles a las producidas por priones, como la vacuolización del neuropilo y del pericarion.

En las siguientes microfotografías se presentan las principales alteraciones histopatológicas observadas en este estudio. En la Figura 7 se puede observar un corte de médula oblongada a nivel de óbex, en el cual se aprecia la presencia de hemorragia focal que se encontraron en 30 (60%) muestras del total de las 50 cortes estudiados.

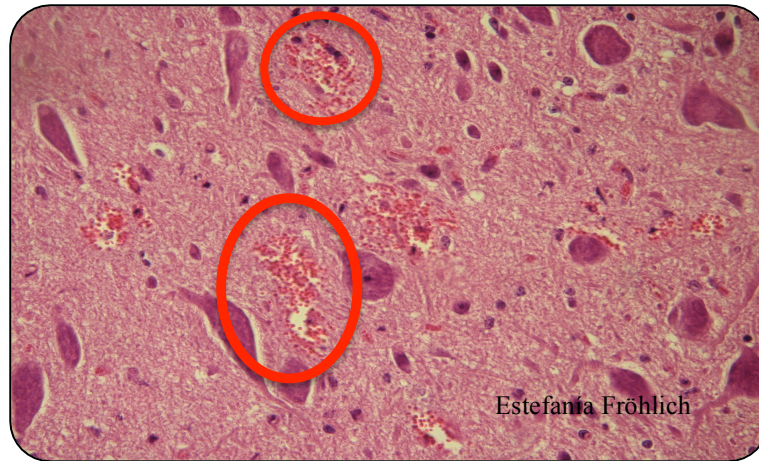


Figura 7: Microfotografía de un corte a nivel de óbex en la cual se observa la presencia de hemorragias focales (círculos) (H/E 400x).

En la Figura 8 se muestra un corte de óbex de caprino en el cual se observa infiltrado perivascular formado por células inflamatorias, en su mayoría células linfocitarias, lesión que fue encontrada en seis (12%) muestras del total de los 50 cortes estudiados.

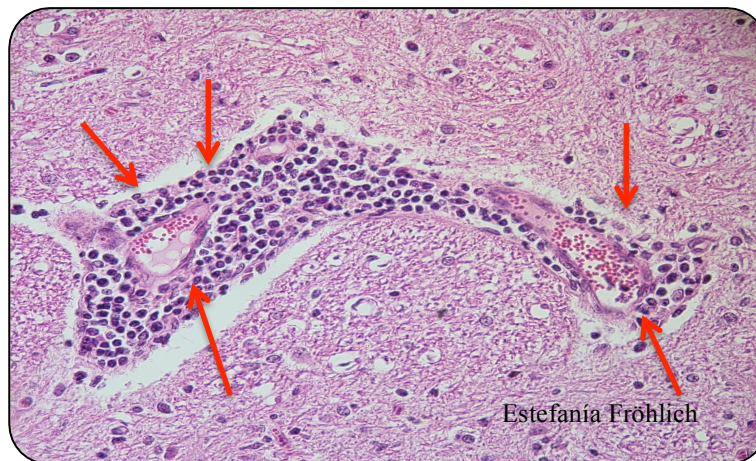


Figura 8: Microfotografía de un corte a nivel de óbex en la cual se observa la presencia de infiltrado perivascular de células inflamatorias (flecha) (H/E 400x).

En la Figura 9 se muestra un corte de óbex en el cual se observan depósitos de pigmentos, lo que corresponde a una lesión histopatológica pigmentaria que fue encontrada en dos (4%) muestras del total de los 50 cortes estudiados.

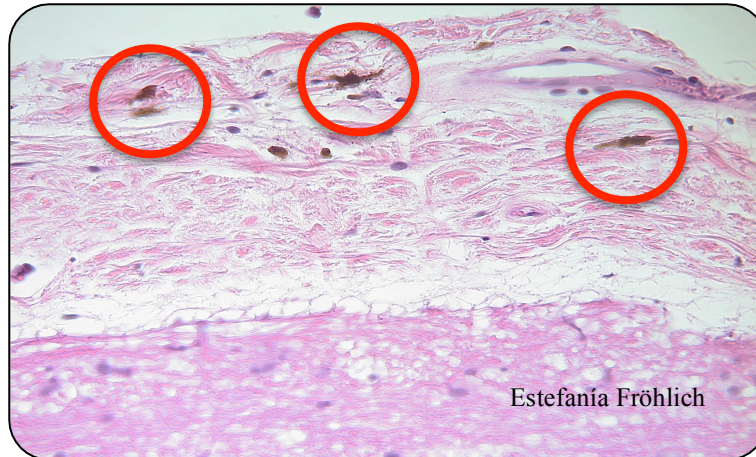


Figura 9: Microfotografía de un corte a nivel de óbex en la cual se observa la presencia de células pigmentarias, melanocitos (círculos) (H/E 400x).

Las 50 muestras analizadas de óbex de caprino fueron comparadas con los controles para Scrapie clásico otorgados por el centro de referencia canadiense. En la Figura 10 se muestra un control negativo de corte a nivel de óbex en el cual se observa una morfología normal del tejido nervioso.

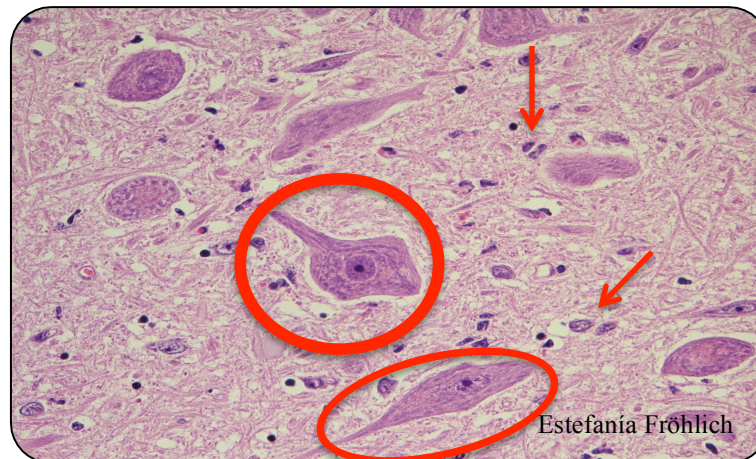


Figura 10: Microfotografía de un control negativo de óbex (H/E 400x). En la cual se observa una morfología normal del tejido nervioso, tejido de sostén o neuroglia (flechas) y neuronas (círculos).

En la Figura 11 se muestra un control positivo de corte a nivel de óbex en el cual se observa la vacuolización o espongirosis del tejido nervioso, que es producida por la acción de priones en el SNC, de acuerdo a lo descrito por literatura.

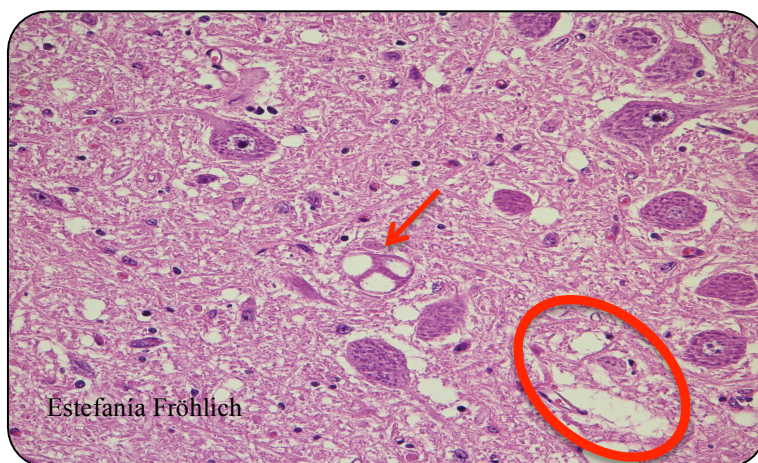


Figura 11: Microfotografía de un control positivo de óbex (H/E 400x). En la cual se observa espongirosis del tejido nervioso, a nivel de pericarion (flecha) y del neuropilo (círculo).

El resumen del análisis histopatológico del estudio de todas las muestras procesadas con la tinción H/E, permitió describir y clasificar los hallazgos encontrados como: hemorragia focal, infiltrado perivascular, pigmentos y muestras sin alteraciones histopatológicas, las que se resumen en la siguiente tabla (Tabla 4):

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis histopatológico de muestras de óbex caprino con la tinción H/E.

Lesiones	Vacuolización del neuropilo y de pericarion	Infiltrado Perivascular	Hemorragia Focal	Pigmentos	Sin lesiones aparentes	Total de muestras
Número de muestras	0	6	30	2	12	50
Porcentaje del total de Muestras Analizadas	0%	12%	60%	4%	24%	100%

Del análisis histopatológico de las muestras de óbex de caprino se puede concluir que en el 24% de las muestras no se encontraron lesiones histopatológicas, mientras que en el 76% restante se observaron alteraciones de tipo hemorrágica focal (Figura 7), infiltrado perivascular de tipo inflamatorio (Figura 8) y células pigmentarias (Figura 9), que no están relacionadas con lesiones producidas por priones.

Luego del análisis histopatológico de las muestras, los cortes homólogos de cada una de ellas se sometieron a la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

Aplicar el método de inmunohistoquímica en óbex de caprinos *post mortem*, para detectar proteínas priónicas.

Análisis inmunohistoquímico de las muestras de óbex en caprinos (IHQ)

Del total de los cortes de óbex caprinos obtenidos de mataderos de la IV región del país, fueron analizados por esta técnica a partir de las 50 muestras aptas obtenidas en el análisis histológico. A continuación se presentan las más importantes y representativas comparadas siempre con los controles positivos y negativos aportados por el centro de referencia canadiense.

Las muestras fueron clasificadas como positivas cuando se observaba la inmunotinción caracterizada por un precipitado granular de color rojo presente en el tejido nervioso. Se analizaron más detalladamente en el sitio anatómico de los siguientes núcleos nerviosos: núcleo del tracto solitario, núcleo parasimpático del nervio vago y núcleo del tracto espinal del nervio trigémino (Schaller, 1996; SAG, 2005; OIE, 2012). Así se consideró negativa toda muestra que no presentara un precipitado granular característico de color rojo en el tejido nervioso. En el caso de una muestra sospechosa se realizó nuevamente el procedimiento diagnóstico con IHQ. Todas las muestras se compararon con los controles positivos y negativos aportados por el laboratorio de referencia, que fueron sometidos a la misma técnica.

En la Figura 12 se presentan los controles caprino (12a) y ovino positivos (12b), a nivel de óbex, a la tinción específica para la PrP^{Sc}, las cuales fueron sometidas a la técnica de IHQ en paralelo con las muestras de óbex caprino en estudio. En estos cortes se observa la

presencia de vacuolas en conjunto con el inmunoprecipitado granular rojo producto de la utilización del cromógeno AEC. Este resultado concuerda con lo descrito anteriormente para muestras positivas de acuerdo con la pauta de análisis de las muestras otorgadas por el laboratorio de referencia canadiense e indicaría la positividad a la presencia del prión, por lo cual se validarán como patrón de comparación y análisis para las muestras de óbex en estudio.

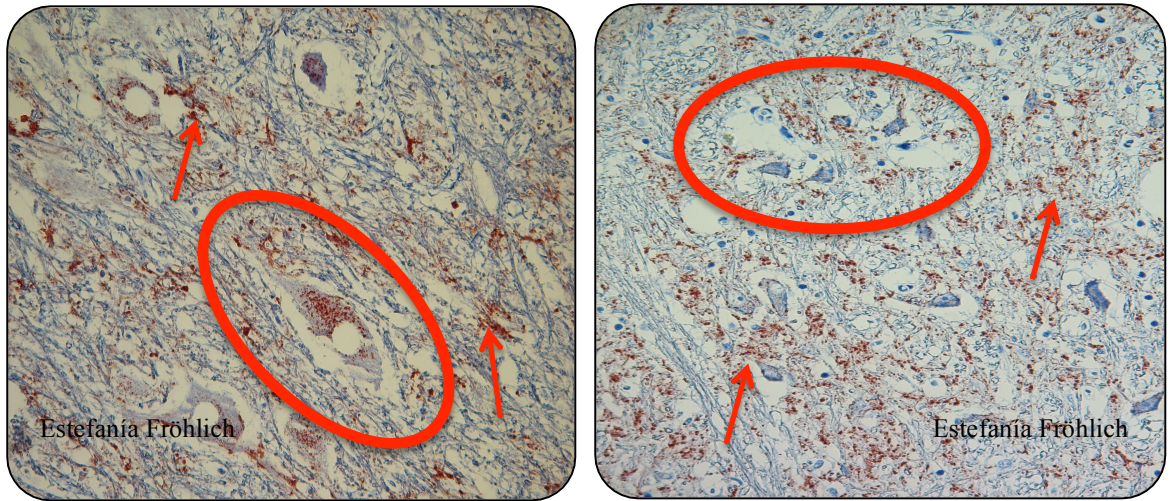


Figura 12: a) Microfotografía de un control positivo de óbex de caprino (IHQ 400x). b) Microfotografía de un control positivo de óbex de ovino (IHQ 400x). En ambas se observa la presencia de numerosas vacuolas o espongiosis del tejido nervioso, a nivel de pericarion y del neuropilo (círculos), y la inmunotinción de precipitado granular rojo (flechas).

En la Figura 13 se presentan controles negativos de caprino (13a) y ovino (13b), que corresponde a un corte de médula oblongada a nivel de óbex analizados con la técnica de IHQ utilizada para este estudio. En estas muestras se observa el tejido nervioso, en el cual no existen vacuolas así como tampoco el precipitado granular característico, lo cual indicaría la ausencia del prión y, por el contrario, sólo se evidencia tejido nervioso con su morfología normal, por lo cual se validaron como controles negativos.

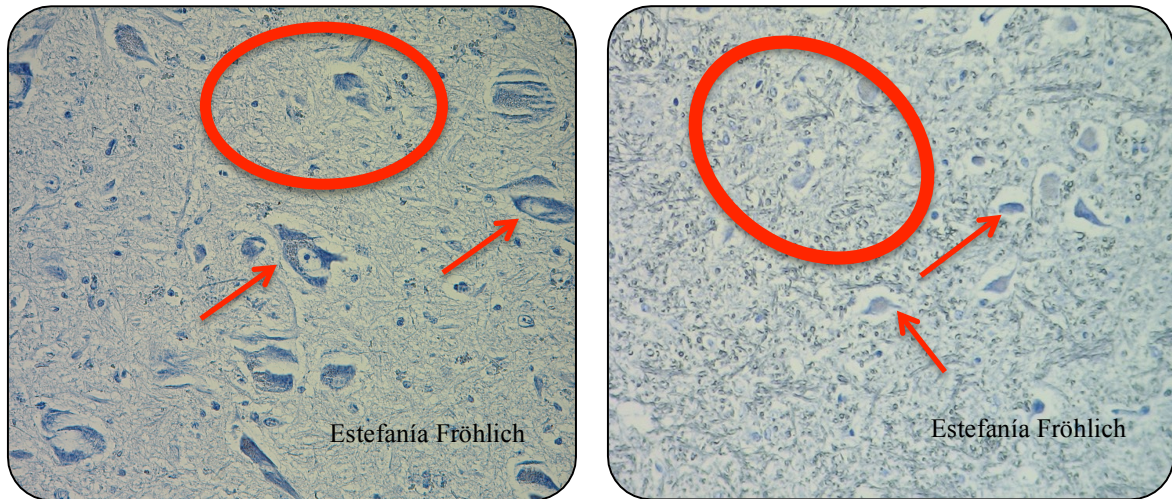


Figura 13: **a)** Microfotografía de un control negativo de óbex de caprino (IHQ 400x). **b)** Microfotografía de un control negativo de óbex de ovino (IHQ 200x). En las que se observa una estructura normal del tejido nervioso (círculo) y somas neuronales (flechas) y no se observa la presencia de vacuolas o espongirosis del tejido nervioso, ni la inmunotinción de precipitado granular rojo.

En la Figura 14 se observa una de las muestras en estudio de los encéfalos caprinos provenientes de la IV región, las cuales fueron analizadas por la técnica de IHQ. En este corte, como en las demás muestras de este estudio se observa la estructura histológica normal del tejido nervioso a nivel de óbex, tanto en las neuroglías como en las neuronas, de las cuales ninguna presentó lesiones vacuolares de tipo espongiforme, ni el precipitado granular rojo, esto indica la ausencia de la PrP^{Sc} por lo cual todas las muestras de óbex de caprinos estudiadas se clasificaron de acuerdo a los parámetros del *Veterinary Laboratory Agency* (Manning *et al.*, 2008) como negativas a Scrapie.

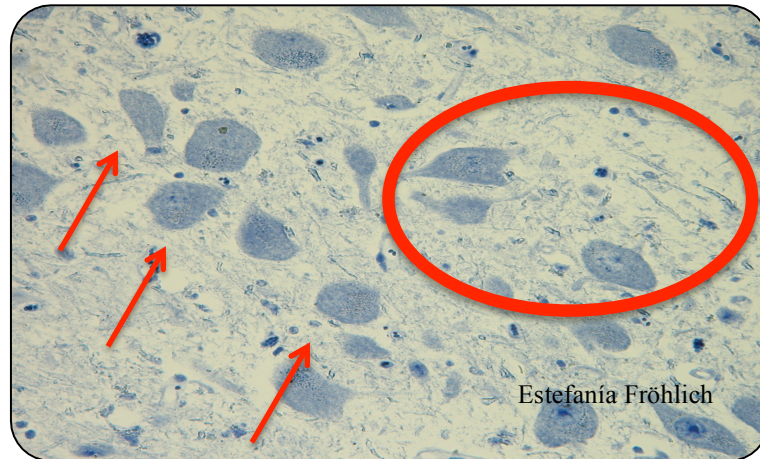


Figura 14: Microfotografía de óbex de caprino (IHQ 400x). Correspondiente a una muestra en estudio en la que se observa una morfología normal del tejido nervioso (círculo) y somas neuronales (flechas). Donde no se observa la presencia de vacuolas, ni la presencia de la inmunotinción de precipitado granular rojo.

El análisis de los controles positivos caprinos (2), entregados por el centro de referencia canadiense, a los cuales se les realizó la técnica de IHQ, permitió evidenciar satisfactoriamente la inmunoreacción de color rojo en el tejido nervioso, así como también la ausencia de la inmunoreacción en las muestras en estudio (50) y los controles negativos caprinos (2).

Las observaciones de todas las muestras de óbex de caprinos (50) de este estudio que fueron analizadas por la técnica de inmunohistoquímica, se resumen en la en la Tabla 5, incluidos los controles positivos y negativos caprinos sometidos a la técnica de IHQ que fueron evaluados de acuerdo a los patrones internacionales del *Veterinary Laboratory Agency* (Manning *et al.*, 2008):

Tabla 5: Resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis Inmunohistoquímico de muestras y controles en óbex caprino.

IHQ	Muestras	Controles	Número de muestras	Porcentaje del total de muestras analizadas
Negativos	50	2	52	96,3%
Positivos	0	2	2	3,7%
Sospechosos	0	0	0	0%
Total de muestras analizadas	50	4	54	100%

Los resultados obtenidos con la técnica de IHQ, permiten señalar que la totalidad de los cuatro (4) controles positivos (caprinos y ovinos), presentaron siempre la inmunotinción observada como precipitado granular de color rojo dado por el cromógeno AEC lo que concuerda con lo descrito. Esto indicaría la presencia del PrP^{Sc} (Figura 12). A diferencia de los cuatro (4) controles negativos (caprinos y ovinos) y de todas las muestras en estudio de los óbex de los caprinos provenientes de mataderos de la IV Región, en los que no se observó inmunotinción así como tampoco vacuolas espongiiformes (Figuras 13 y 14).

Esto nos confirma que el 100% las muestras analizadas son realmente negativas a Scrapie clásico mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Con los resultados descritos anteriormente y en base a lo descrito por diferentes autores es que en este trabajo se discuten los siguientes contenidos:

DISCUSIÓN

El Scrapie, que afecta a ovinos, caprinos y muflones, como todas las enfermedades causadas por priones, es neurodegenerativa y eventualmente fatal, de progresión lenta, sin respuesta inflamatoria y tampoco inmune frente a su replicación en el huésped, lo que disminuye las posibilidades de detección temprana en los animales afectados (Fast y Groschup, 2013). El agente causal corresponde al prión (PrP^{Sc}), isoforma alterada de una proteína celular constitutiva de membrana, presente en la mayoría de los mamíferos y también en aves y reptiles (Prusiner, 1998; Westergard *et al.*, 2007; Soto, 2011).

La estructura de la PrP^{Sc} y su variante proteolítica truncada, PrP 27-30, han disminuido su determinación experimental debido a su insolubilidad y su propensión de formar agregados (Zou, 2013). Para llenar este vacío y predecir sus estructuras se ha utilizado el modelamiento molecular, pero con esto se han generado modelos significativamente diferentes, lo que revela las limitaciones del método (Requena y Wille, 2014). En la ausencia de una estructura tridimensional se han usado distintas técnicas para poder acercarse a la estructura de esta isoforma, de importancia en las áreas biológica, médica y agropecuaria (Requena y Wille, 2014).

La importancia de las EETs se genera a partir de su característica zoonóticas que se ha detectado en cepas que afectan a animales de ganadería, específicamente a los bovinos. La EEB representa un problema de importancia tanto a nivel económico como para la salud pública. Sin embargo, de acuerdo al “Atlas Mundial de Enfermedades del Ganado 2011” (World Bank, 2011), el Scrapie está en el octavo puesto del ranking mundial de las causas de pérdida de ovinos y caprinos, de un total de 676 enfermedades en estudio (World Bank, 2011).

A pesar de la denominada barrera interespecie esta no es infranqueable. De hecho, el inicio de la EEB en ganado bovino se ha atribuido originalmente a la utilización de harinas cárnicas con contenido de proteínas de ovejas infectadas de Scrapie (Priola, 2013; Cifuentes, 2014). En el caso de la ECJ^V, las diferencias entre las secuencias de la PrP del humano y los bovinos, es de algo más de 30 aminoácidos (Moda *et al.*, 2013; Priola, 2013). Aun así, los casos detectados de la ECJ^V podrían indicar, al confirmarse su origen en el consumo de productos cárnicos de origen bovino contaminados con PrP^{Sc} , que también esta

barrera de especie puede superarse (Cohen y Prusiner, 1998; Moda *et al.*, 2013; Priola, 2013). Trabajos recientes con ratones transgénicos indican que pasajes del prión de la EEB en los ovinos, incrementa su virulencia y habilidad para ser transmitido a otras especies (Espinosa *et al.*, 2007; Tamgüney *et al.*, 2009).

Sin duda que el mayor riesgo sobre la actividad comercial, es la que representa la integración del prión que provoca la EEB a la cadena alimentaria humana (World Bank, 2011; Cifuentes, 2014). Sin embargo, no existe evidencia de que el prión del Scrapie que afecta a ovinos y a caprinos, sea capaz de atravesar directamente la barrera interespecie y provocar algún cuadro de ECJ en el humano (Vaccari *et al.*, 2009). Lo que si se ha demostrado es la transmisión de la EEB a los ovinos, convirtiendo al Scrapie en una potencial amenaza para la salud humana (Detwiler y Baylis, 2003). La alerta respecto a los priones que afectan a los pequeños rumiantes se basa en la existencia de estirpes diferentes a la clásica, cuyo comportamiento se mantiene impredecible y sus caracterizaciones aún no son bien entendidas, por lo que deben ser detectadas y analizadas para su posterior evaluación de riesgo (Vaccari *et al.*, 2009).

Usando casos subclínicos de Scrapie y ganado ovino infectado con EEB, un estudio reciente reveló la presencia de priones en tejidos que supuestamente no son de riesgo, como el hígado, estos fueron detectados por medio de una prueba de rutina en la que se incrementó la sensibilidad de la interpretación (Everest *et al.*, 2011; Cifuentes, 2014). Estos estudios experimentales llevan a asumir la potencial emergencia de las PrP patológicas de ovinos y caprinos, por la posibilidad de ingreso de productos alimenticios contaminados al consumo humano.

Un punto de discusión importante se refiere a la posibilidad de transmisión del Scrapie hacia el humano, situación que es manifiesta y ha sido descrita con la aparición de la ECJ^v del humano a partir de la EEB, a través del consumo de productos cárneos contaminados (van Keulen *et al.*, 2008; Wadsworth *et al.*, 2011). A esto se suma la identificación por la *European Food Safety Authority* (EFSA), de dos variantes diferentes al Scrapie clásico, debido a que se han mejorado las técnicas moleculares de diagnóstico y caracterización de los priones, clasificándose hoy como clásicas, atípicas y tipo-EEB, de las cuales se desconoce el potencial peligro por presentar una patogenia diferente a la cepa clásica, lo

que no permite asegurar que no se comporten como la zoonosis que pudieran representar al ingresar a los alimentos (Vaccari *et al.*, 2009; Juste *et al.*, 2012; Farías, 2013; Cifuentes, 2014).

Puesto que la EEB es zoonótica y ya que su origen tuvo relación con el Scrapie que afecta a ovinos y caprinos, es que se considera necesaria y apropiada la monitorización sistemática de esta enfermedad en los pequeños rumiantes, para así proteger la condición sanitaria de estas especies a nivel nacional, por el potencial rol que tendrían los ovinos y caprinos como reservorio de enfermedades producidas por priones en el ganado (Cifuentes, 2014; OMS, 2016).

El Scrapie es endémico en Europa y Norteamérica, lo cual llevó a la instauración de programas de vigilancia activa en el año 2002 en Europa y el desarrollo de programas acelerados de erradicación el año 2000 por Estados Unidos (SAG, 2007; OIE, 2016a). En Chile, debido a que nunca ha sido diagnosticada la enfermedad, los programas de vigilancia que se realizan son sólo de tipo pasivo e incluso no son especificados ante la autoridad sanitaria pertinente (Núñez, 2004). Sin embargo, al estudiar la realidad del Scrapie, que de acuerdo a lo descrito originó la epidemia de EEB en Europa, queda de manifiesto la importancia de establecer nuevas medidas de vigilancia para la enfermedad en el país, puesto que en este continente el Scrapie fue diagnosticado en Brasil el año 2007, por lo que Argentina y Ecuador ya realizan programas activos de vigilancia (Núñez, 2004; SAG, 2007; Cifuentes, 2014).

En Chile, se mantiene el plan de vigilancia activa y pasiva para la EEB (Núñez, 2004; SAG, 2016). Con respecto al Scrapie el Servicio Agrícola y Ganadero sólo realiza vigilancia activa y pasiva para ovinos, siendo escaso el conocimiento respecto a la especie caprina a diferencia de lo que ocurre con los ovinos, en la que es levemente mayor por la relevancia económica de exportación que representa esta última especie para Chile (Núñez, 2004). Previo al año 2017, no se habían estandarizado las pruebas necesarias para la prevención y control de esta encefalopatía que afecta a ovinos y caprinos. Este cambio se realizó con el propósito de demostrar al mercado internacional que el país está libre de esta enfermedad que afecta a los pequeños rumiantes, en este punto radica la importancia del estudio de esta memoria de título, que busca aportar información del estatus sanitario de un

grupo de animales del país (SAG, 2016; 2017).

Chile forma parte de un grupo de 46 países que han acreditado su condición libre de EEB, desde el año 2009 (OIE, 2016d). Esta certificación abre los mercados para la exportación de productos y subproductos derivados de la ganadería bovina nacional. Si bien en nuestro país no se ha detectado Scrapie en pequeños rumiantes, en Brasil se detectó un caso el año 2007. Así mismo, el 2012 y 2014, se diagnosticaron casos en bovinos afectados con EEB de la forma atípica, lo que puso en alerta y estimuló la instauración de programas de vigilancia de la región, como lo hicieron Ecuador y Argentina (Farías, 2013; Cifuentes, 2014).

Sin embargo, aún se desconoce la verdadera situación de la enfermedad en muchos países, debido a que usualmente existe un inadecuado sistema de vigilancia pasiva para detectar a los animales afectados.

Esta memoria de título es un aporte en la aplicación de la técnica de IHQ a nivel país. Es casi imposible establecer el estado de libertad de la infección sin antes establecer un sistema de vigilancia activo, que incluye la examinación de todos los animales que han muerto en el rebaño y que han sido eutanasiados por emergencia (Detwiler y Baylis, 2003; OIE, 2013a;b; Cifuentes, 2014). Esto se ejemplifica por la introducción de un programa de vigilancia activo en toda la UE el año 2003, establecido para Scrapie en ovinos y caprinos. En el contexto del programa, se examinaron para EETs todos los animales mayores a 18 meses de edad (muertos, eutanasiados de emergencia, como también animales sanos eutanasiados) (Detwiler y Baylis, 2003).

Resumiendo, la prevalencia de las enfermedades causadas por EETs en pequeños rumiantes a nivel mundial, es una tarea muy difícil de realizar debido a: su largo periodo de incubación, la falta de un método de detección práctico *ante mortem* (el cual preventivamente detecta animales infectados subclínicamente), los signos clínicos variables (que pueden presentar animales no identificados), los potencialmente no reconocidos componentes genéticos codificados en los hospederos (lo cual influye en el riesgo de infección y el periodo de incubación) y la aún no completamente entendidas rutas de transmisión (Benestad *et al.*, 2003; Detwiler y Baylis, 2003; Ulvund, 2008).

Así, la habilidad de una detección temprana y segura es vital para que el diagnóstico del

Scrapie tenga un valor real, particularmente en animales destinados al consumo humano, como lo son los caprinos. Estos animales tienen una exigencia adicional para determinar la presencia del prión en tejidos de animales de matadero de apariencia saludable y clínicamente asintomáticos, que son destinados a consumo humano (Núñez, 2004; Farías, 2013; Cifuentes, 2014). Por estos antecedentes es que este estudio se realizó con animales de matadero.

Un dato relevante en la enfermedad clásica del caprino es que la proteína priónica se acumula primero en el tejido linfoide y luego en el SNC, tanto en el Scrapie, ECJ^v y la EDC. Sin embargo, durante la acumulación en el tejido linfoide no se generan lesiones asociadas en dicho tejido en contraposición con lo que ocurre en el SNC (Ulvund, 2008).

En términos de las directrices dictaminadas por la OIE (2012), respecto al diagnóstico, se mantiene como estructura anatómica referencial al óbex en el tronco encefálico. Actualmente para el diagnóstico del Scrapie ovino y caprino en el país se utilizan muestras *post mortem* del SNC, examinadas por histopatología en conjunto con la técnica de IHQ (Farías, 2013).

Pese al mayor tiempo demandado para su realización, en comparación a las pruebas denominadas “rápidas” como el ELISA y el *Western Blot* (Farías, 2013), la IHQ presenta importantes ventajas, ya que puede ser realizada con otros tejidos distintos al SNC alcanzando muy buenos resultados. De acuerdo a esto se ha planteado que algunas pruebas rápidas pueden no detectar la PrP^{Sc} de origen ovino en muestras de tejido nervioso, se puede afirmar que la inmunohistoquímica es la prueba más confiable, segura y confirmatoria para el diagnóstico del Scrapie en relación a otras técnicas de inmunodiagnóstico, como son las pruebas rápidas: *Western Blot* y/o el ELISA, tal y como lo reconoce la OIE desde el año 2000 (Farías, 2013; Cifuentes, 2014).

En este trabajo se utilizaron solamente animales sobre los 2 años de edad, animales que llegaron a matadero en un total de 50 animales (50 óbex). Se realizaron dos cortes seriados a nivel de óbex, obteniendo así un total de 100 cortes. 50 de ellos fueron utilizados para la técnica de H/E, con ésta se analizaron las muestras con técnicas histopatológicas, donde fue posible detectar los núcleos necesarios para el diagnóstico, los cuales son el núcleo del tracto solitario, núcleo del tracto espinal del nervio trigémino y núcleo parasimpático del

nervio vago. Obteniendo una eficiencia en que el 100% de los cortes presentaron la aptitud establecida para ser sometidas a la técnica de IHQ (SAG, 2005; OIE, 2012; Cifuentes, 2014). Al estudiar los cortes histopatológicamente, se evidenciaron algunas lesiones histopatológicas, las cuales fueron: hemorragia focal, infiltrado perivascular y pigmentario, no siendo lesiones similares a las producidas por priones, como la vacuolización del neuropilo y del pericarion. Estas lesiones histopatológicas se asocian a distintas causas, en el caso de la hemorragia focal se estableció que son debido al tipo de eutanasia de los animales de matadero; el infiltrado perivascular se asocia a procesos inflamatorios (causas desconocidas), los cuales no se presentan en el Scrapie clásico y los pigmentos se pueden asociar a melanina o neuromelanina.

En cuanto a la prueba de IHQ realizada en este estudio se pudo corroborar la utilidad diagnóstica del *kit Pullman* Monoclonal (F99/97.6.1), que contiene el anticuerpo específico para detectar a la PrP^{Sc} por IHQ y el cromógeno AEC, para revelar la reacción. Este *kit* ha sido utilizado por otros autores en tejido de mucosa rectal de la especie ovina y caprina de nuestro país (Farías, 2013). Se validó la utilidad del *kit* al obtener el inmunomarcaje esperado en los controles positivos aportados por el centro de referencia canadiense. Sin embargo, lo que determinó que el *kit* funcionara, fue su correcta aplicación al seguir el protocolo establecido por el fabricante.

Todos los cortes histológicos obtenidos de las muestras provenientes de caprinos de la IV región del país resultaron negativos a Scrapie, lo que coincidió con los resultados de Sanhueza (2010), Farías (2013) y Cifuentes (2014), obtenidos en la especie ovina, desde la IV y XII regiones. Sin embargo, cabe agregar que este estudio involucró una selección aleatoria de animales con un tamaño muestral muy reducido (50 caprinos), siendo que la masa ganadera caprina contabilizada según censo agropecuario (INE, 2010), indicó aproximadamente 705.527 cabezas de ganado caprino en nuestro territorio nacional (INE, 2010). Cabe destacar que la mayor parte de la masa caprina del país está en manos del sector socioeconómico más humilde, pequeños productores; quienes comercializan principalmente sus productos cárnicos y lácteos en el mercado informal (INE, 2010).

Por otra parte, al analizar los resultados de la inmunoreacción que se presentaron con la IHQ, éstos coincidieron con los encontrados con muestras de bovinos (Manning *et al.*,

2008), por lo que se concluyó que; como en la totalidad de las muestras no se observó inmunotinción específica, así como tampoco lesiones vacuolares en las zonas anatómicas específicas del óbex, todas las muestras fueron negativas a Scrapie con la técnica de inmunohistoquímica. En este caso, el método inmunohistoquímico se realizó bajo las condiciones del laboratorio oficial de diagnóstico de las EETs en Chile (Laboratorio de Patología Pecuaria Lo Aguirre, perteneciente al SAG), el cual presentó un 100% de sensibilidad y de especificidad para Scrapie (Tabla 5), lo cual concuerda con Manning *et al.* (2008).

En el caso de las muestras utilizados como controles para la IHQ, dos (2) ovinos y dos (2) caprinos, mostraron que en la totalidad de los cortes de la médula oblongada a nivel de óbex, todos los positivos siempre presentaron el precipitado granular rojo indicativo de la inmunoreacción del anticuerpo con la PrP^{Sc}. Lo que indica su localización en los núcleos nerviosos afectados y la visualización de vacuolas en el núcleo del tracto solitario los que nunca se observaron en los óbex de los controles negativos.

De acuerdo a lo señalado anteriormente y con el análisis de los resultados obtenidos, se pueden afirmar las siguientes conclusiones:

CONCLUSIÓN

1. La tinción de H/E permitió la observación de lesiones no atribuibles a priones y la evaluación de aptitud de la muestra, presentando todos los núcleos nerviosos necesarios para el diagnóstico.
2. Todas las muestras de óbex evaluadas mediante la técnica de IHQ fueron negativas a Scrapie clásico, así como también los controles ovinos y caprinos negativos, no presentando la inmunotinción.
3. Los controles positivos de ovino y caprino utilizados siempre presentaron la inmunotinción.
4. Los resultados obtenidos en esta memoria de título validan la aplicación de la técnica de IHQ a nivel de óbex, como método de diagnóstico de Scrapie clásico caprino en el país.
5. Las condiciones de trabajo existentes en el laboratorio de la unidad de patología del SAG fueron óptimas para la utilización del *kit* diagnóstico para la enfermedad.
6. Actualmente existe una baja vigilancia de Scrapie clásico en la especie caprina por parte de los programas sanitarios de Chile, lo que ha imposibilitado comprobar el estatus sanitario para la enfermedad. Es recomendable seguir estudiando a esta especie debido a que actúa como reservorio de Scrapie clásico.

BIBLIOGRAFÍA

ANDRÉOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; VAN KEULEN, L.; SCHELCHER, F.; ELSEN, J.; LANTIER, F. 2000. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol.* 81(12): 3115-3126.

ANDRÉOLETTI, O.; LACROUX, C.; CHABERT, A.; MONNEREAU, L. ; TABOURET, G. ; LANTIER, F. ; BERTHON, P. ; EYCHENNE, F. ; LAFOND-BENESTAD, S. ; ELSEN, J. ; SCHELCHER, F. 2002. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol.* 83: 2607-2616.

ANDRESEN, H. 2009. Priones y encefalopatías espongiiformes. [En línea]. Argentina. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/81-priones.pdf. [20-04-2016].

BARILLET, F.; MARIAT, D.; AMIGUES, Y.; FAUGERAS, R.; CAILLAT, H.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; RUPP, R.; BABILLIOT, J.; LACROUX, C.; LUGAN, S.; SCHELCHER, F.; CHARTIER, C.; CORBIERE, F.; ANDRÉOLETTI, O.; PERRIN-CHAUVINEAU, C. 2009. Identification of seven haplotypes of the caprine PrP gene at codons 127, 142, 154, 211, 222 and 240 in French Alpine and Saanen breeds and their association with classical scrapie. *J Gen Virol.* 90:769–776.

BENESTAD, S.; SARRADIN, P.; THU, B.; SCHÖNHEIT, J.; TRANULIS, MA.; BRATBERG, B. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 153:202–208.

BENETTI, F.; LEGNAME, G. 2015. New insights into structural determinants of prion protein folding and stability. *Prion.* 9(2):119-124.

BESNOIT, M.; MOREL, C. 1898. Note sur les lésions nerveuses de la tremblante du 883 mouton. *Rev Med Vet.* 23:397–400.

BIASINI, E.; HARRIS, D. 2013. Infectious and Pathogenic Forms of PrP. **In:** Prions and Diseases: Volume 1, Physiology and Pathophysiology. Springer. Nueva York, EEUU. pp. 135-146.

BROWN, K.; MASTRIANNI, J. 2010. The Prion Diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23(4):277-298.

BROWN, P. 2013. Transmissible Spongiform Encephalopathy: From its Beginnings to Daniel Carlton Gajdusek. **In:** Prions and Diseases: Volume 1, Physiology and Pathophysiology. Springer. Nueva York, EEUU. pp.1-19.

BROWN, P.; GAJDUSEK, C. 1991. Survival of scrapie virus after three years interment. *Lancet.* 337:269–270.

BRUN, A.; CASTILLA, J.; RODRIGUEZ, F.; TORRES, J. 2003. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las encefalopatías espongiiformes transmisibles. *Rev Neurol.* 37: 648-653.

CACACE, V. 2011. *Biology of Prions.* Instituto de investigaciones cardiológicas. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. pp.55.

CAPELLARI, S.; STRAMIELLO, R.; SAVIERONI, D.; KETSCHMAR, H.; PARCHI, P. 2011. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 121(1):21-37.

CARAMELLI, M.; RU, G.; ACUTIS, P.; GIANLUIGI, F. 2006. Prion diseases: Current understanding of epidemiology and pathogenesis, and therapeutic advances. *CNS Drugs.* 20(1):15-28.

CARRION, A. 2007. ¿Puede ser la leche una vía de transmisión de priones?. *RCCV.* 1(2):267-266.

CASTILLA, J.; BRUN, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; TORRES, J. 2002. Encefalopatías Espongiiformes Transmisibles en especies ganaderas y silvestres. *Invest. Agr Prod Sanid Anim.* 17(1-2):21-36.

CIFUENTES, B. 2014. Aplicación de la inmunohistoquímica para detectar Scrapie en tejido linfóide en mucosa rectal de caprinos. Memoria de título Médico Veterinario. Fac. Cs Vet y Pec., U. de Chile, Santiago de Chile. pp.70.

COHEN, F.; PRUSINER, S. 1998. Pathologic Conformations of Prion Proteins. *Annu Rev Biochem.* 67:793-819.

COLLINS, S.; LAWSON, V.; MASTERS, C. 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet.* 363(9402):51-61.

CORBIÉRE, F.; CHAUVINEAU-PERRIN, C.; LACROUX, C.; LUGAN, S.; COSTES, P.; THOMAS, M.; BRÉMAUD, I.; CHARTIER, C.; BARILLET, F.; SCHELCHER, F.; ANDRÉOLETTI, O. 2013. The Limits of Test-Based Scrapie Eradication Programs in Goats. *PLoS ONE.* 8(1):1371.

DEFRA (DEPARTMENT FOR ENVIROMENT FOOD AND RURAL AFFAIRS). 2008. Animal health and welfare. BSE: Others TSEs-Scrapie. Clinical signs. <<http://www.defra.gov.uk/.animalh/bse/othertses/scrapie/index/index.html>> [Consulta: 21-03-2015].

DETWEILER, L.; BAYLIS, M. 2003. The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech.* 22(1):121-143.

DOBSON, C. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci.* 24(9):329-332.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). 2009. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Scientific Opinion on genetic TSE resistance in goats in all European Union Member States. EFSA J. 7:1371–1411.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). 2013. Scientific Opinion on the risk of transmission of classical scrapie via *in vivo* derived embryo transfer in ovine animals. EFSA J. 11(2):3080-3095.

EPSTEIN, E.; BEECHER, N. 2005. Mad cow disease, Creutzfeld-Jakob disease, other TSEs, and biosolids. J Res Sci Technol. 2:181–187.

ESPINOSA, J.; ANDREÓLETTI, O.; CASTILLA, J; HERVA, M; MORALES, M; ALAMLLO, E; DIAZ, S; LACROUX, C; LUGAN, S; SALGUERO, F; LANGEVELD, J; TORRES, J. 2007. Sheep-passaged BSE agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice. J Virol. 81:835–843.

EVEREST, S.; RAMSAY, A.; CHAPLIN, M.; EVERITT, S.; STACK, M.; NEALE, M.; JEFFREY, M.; MOORE, S.; BELLWORTHY, S.; TERRY, L. 2011. Detection and localisation of PrP^{Sc} in the liver of sheep infected with scrapie and bovine spongiform encephalopathy. PLoS ONE 6(5):e19737.

FAO (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION). 2003. Consulta Técnica sobre Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). [En línea]. <http://www.fao.org/3/a-ai017s.pdf> [Consulta: 16-09-2016].

FARÍAS, G . 2013. Diagnóstico preclínico de Scrapie en tejido linfóide de ovinos. Tesis Doctoral. Córdoba, España, Universidad de Córdoba. pp.140.

FAST, C.; GROSCUP, M. 2013. Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. **In:** Prions and Diseases: Volume 2, Animals, Humans and the Environment. Springer. Nueva York, EEUU. pp.15-44.

GAVIER-WIDEN, D., STACK, M., BARON, T., BALACHANDRAN, A., SIMMONS, M. 2005. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. J Vet Diagn Invest. 17:509-527.

GEORGSSON, G.; SIGURDARSON, S.; BROWN, P. 2006. Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. J Gen Virol. 87:3737–3740.

GOLDMANN, W. 2008. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. Vet Res. 39:30.

GONZÁLEZ, L.; MARTIN, S.; SISÓ, S.; ORTIZ, A.; PHELAN, L.; GOLDMAN, W.; STEWART, P.; SAUNDERS, G.; WINDL, O. 2009. High prevalence of scrapie in a dairy goat herd: tissue distribution of disease-associated PrP and effect of PRNP genotype and age. Vet Res. 40(6):65.

GONZÁLEZ, L.; PITARCH, J.; MARTIN, S.; THURSON, L.; MOORE, J.; ACÍN, C.; JEFFREY, M. 2014a. Identical Pathogenesis and Neuropathological Phenotype of Scrapie in Valine, Arginine, Glutamine/Valine, Arginine, Glutamine Sheep Infected Experimentally by the Oral and Conjunctival Routes. *J Comp Pathol.* 150(1):47-56.

GONZÁLEZ, L.; PITARCH, J.; MARTIN, S.; THURSON, L.; SIMMONS, H.; ACÍN, C.; JEFFREY, M. 2014b. Influence of Polymorphisms in the Prion Protein Gene on the Pathogenesis and Neuropathological Phenotype of Sheep Scrapie after Oral Infection. *J Comp Pathol.* 150(1):57-70.

GONZALEZ-ROMERO, D.; BARRIA, MA.; LEON, P.; MORALES, R.; SOTO, C. 2008. Detection of infectious prions in urine. *FEBS Lett.* 582:3161–3166.

HÖRNLIMANN, B.; VAN KEULEN, L.; ULVUND, M.; BRADLEY, R. 2006. Portrait of scrapie in sheep and goats. **In:** Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H. Prions in human and animals. Walter de Gruyter GmbH & CO KG, Berlin. pp.228.

HUNTER, N. 2007. Scrapie—Uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochim Biophys Acta.* 1772(6):619–628.

HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; MARSHALL, E.; O’NEILL, G. 2000. Sheep and goats: natural and experimental TSEs and factors influencing incidence of disease. *Arch Virol Suppl.* 16:181–188.

HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; SMITH, G.; HOPE, J. 1994. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Arch Virol.* 137:171–177

INE (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS). 2010. Censo Caprino 2010. [En línea]. <http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/050711/caprino_1005072011.pdf> [Consulta: 25-04-2016].

JEFFREY, M.; GONZALEZ, L. 2004. Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Curr Top. Microbiol Immunol.* 284:65–97.

JEFFREY, M.; GONZALEZ, L. 2007. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropath Appl Neurobiol.* 33:373–394.

JEFFREY, M.; MARTIN, S.; GONZALEZ, L, FOSTER, J.; LANGEVELD, J.; VAN ZIJDERVELD, F.; GRASSI, J.; HUNTER, N. 2006 Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol.* 134(2–3):171–181.

JOHNSON, C.; PHILLIPS, K.; SCHRAMM, P.; MCKENZIE, D.; AIKEN, J., PEDERSEN, J. 2006. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathog.* 2(4):e3.

JUSTE, R.; TORRES, J.; HOUWERS, D. 2012. Epidemiological indication for a role of sheep in the emergence of variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Vet Microbiol.* 154(3-4):422-424.

KITTELBERGER, R.; CHAPLIN, M.; SIMMONS, M.; RAMIREZ-VILLAESCUSA, A.; MCINTYRE, L.; MACDIARMID, S.; HANNAH, M.; JENNER, J.; BUENO, R.; BAYLISS, D.; BLACK, H.; PIGOTT, C.; O’KEEFE, J. 2010 Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J Vet Diagn Invest.* 22:863-875.

KONOLD, T.; MOORE, S.; BELLWORTHY, S.; SIMMONS, H. 2008. Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC. Vet Res.* 4:14.

LASMEZAS, C. 2003. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 22(1):23-26.

LLEWELYN, C.; HEWITT, P.; KNIGHT, R.; AMAR, K.; COUSENS, S.; MACKENZIE, J.; WILL, R. 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet.* 363:417–421.

MANNING, L.; O’ROURKE, K.; KNOWLES, D.; MARSH, S.; SPENCER, Y.; MOFFAT, E.; WELLS, G; CSEB, S. 2008. A collaborative Canadian-United Kingdom evaluation of an immunochemistry protocol to diagnose bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Diagn Invest.* 20:504-508.

MASTRIANNI, J. 2014. Prion Diseases. **In:** Rosenberg’s Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease. 5^a ed. Elsevier. San Diego, EEUU. pp.229-254.

MATTHEWS, D.; JEFFREY, M.; SIMMONS, M.; STACK, M.; WELLS, G.; WILESMITH, J. 2004. Bovine spongiform encephalopathy. **In:** OIE International Committee. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), vol 2. World Organisation for Animal Health. OIE. pp.642–653.

MILLHAUSER, G. 2013. The Rich Chemistry of the Copper and Zinc Sites in Cellular Prion Protein. **In:** Prions and Diseases: Volume 1, Physiology and Pathophysiology. Springer. Nueva York, EEUU. pp.21-34.

MODA, F.; PRITZKOW, S.; SOTO, C. 2013. Protein Misfolding Cyclic Amplification. **In:** Prions and Diseases: Volume 1, Physiology and Pathophysiology. Springer. Nueva York, EEUU. pp. 83-92.

MOORE, R.; VORBERG, I.; PRIOLA, S. 2005. Species Barriers in Prion Disease – brief review. **In:** Infectious Diseases from Nature: Mechanisms of Viral Emergence and Persistence. Spriger. Nueva York, EEUU. pp.187-202.

NÚÑEZ, P. 2004. Detección y caracterización de proteínas priónicas en óbex de bovino mediante inmunotransferencia. Memoria título Médico Veterinario. Fac. Cs. Vet. y Pec., U. de Chile, Santiago de Chile. pp.41-43.

OIE (ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2012. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Manual Terrestre. [En línea] < <http://www.oie.int/es/manual-de-las-pruebas-de-diagnostico-y-de-las-vacunas-para-los-animales-terrestres/>> [Consulta: 24-06-2016]

OIE (ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2013a. Manual terrestre. Prurigo lumbar. Capítulo 2.7.13. [En línea] http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.07.13.%20Prurigo%20lumbar.pdf [Consulta: 14-02-2016]

OIE (ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2013b. Manual terrestre. Encefalopatía espongiforme bovina. Capítulo 2.3.13. [En línea] <http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.13_Encefalopatia_espongiforme_bovina.pdf> [Consulta: 14-02-2016].

OIE (ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2016a. Resolutions adopted during the 84th General Session, 22 - 27 May 2016. [En línea]. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/About_us/docs/pdf/Session/2016/E_RESO_2016_public.pdf> [Consulta : 11-07- 2016].

OIE (ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2016b. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Prurigo lumbar. Capítulo 14.8. [En línea]. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_scrapie.pdf. [Consulta: 22-06-2016]

OIE (ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2016c. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Encefalopatía Espongiforme Bovina. Capítulo 11.4. [En línea]. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_bse.pdf> [Consulta: 22-06-2016]

OIE (ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). 2016d. Animal Health Information. Information Zoosanitaire. [En línea] http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation [Consulta: 11-11-2016]

OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2016. Zoonoses. Surveillance and control. BSE. [En línea] < <http://www.who.int/zoonoses/diseases/surveillance/en/>>. [Consulta: 02-04-2016].

PASTRANA, M. 2008. Aislamiento y caracterización de una fracción de PrPSc sensible a proteinasa K (SPrPsc); estudios estructurales sobre la PrPsc. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Compostela España. pp.31-57.

PRIOLA.; S. 2013. Species Barriers in Prion Diseases. **In:** Prions and Diseases: Volume 2, Animals, Humans and the Environment. Springer. Nueva York, EEUU. pp.139-154.

- PRUSINER, S.** 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci.* 95(23):13363-83.
- REQUENA, J.; WILLE, H.** 2014. The structure of the infectious prion protein. *Prion.* 8(1):60-66.
- REY-GAYO, A.; CALBO, F.** 2002. Estructura de proteínas: plegamiento y priones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 20(4):141-190.
- RYDER, S.; SPENCER, Y.; BELLERBY, P.; MARCH, S.** 2001. Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec.* 148:7-13.
- RYOU, C.** 2007. Prions and prion diseases: fundamentals and mechanistic details. *J Microbiol Biotechnol.* 17(7):1059-1070.
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO).** 2005. Colecta y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Manual de Contingencia de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). BIOSEM/IT2. [En línea] <http://www.sag.cl/sites/default/files/IT_2_BIOSEM_COLECTA_ENVIO_MUESTRAS.pdf> [Consulta: 13-04-2016]
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO).** 2007. Instructivo Técnico para la Vigilancia de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Programa de Vigilancia Epidemiológica. VIGEP/IT2. [En línea] <http://www.sag.cl/sites/default/files/IT_2_VIGILANCIA_EET.pdf> [Consulta: 13-04-2016]
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO).** 2014. Informe Sanidad Animal, Chile, Año 2014. [En línea] <http://www.sag.cl/sites/default/files/situacion_sanitaria_animal_2014.pdf> [Consulta: 13-04-2016].
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO).** 2015. Lista de Enfermedades de denuncia obligatoria (EDO) al SAG. [En línea] <http://www.sag.cl/sites/default/files/enfermedades_denuncia_obligatoria_sag_8-6-2015.pdf> [Consulta: 13-04-2016].
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO).** 2016. Plan anual de vigilancia de enfermedades 2016. Sub Departamento de Sanidad Animal, Unidad de Vigilancia de Enfermedades, División de Protección Pecuaria. Chile. pp.29-30.
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO).** 2017. Plan anual de vigilancia de enfermedades exóticas 2017. Departamento de Sanidad Animal, Sub Departamento de Vigilancia de Enfermedades, División de Protección Pecuaria. Chile. pp.41-43.

SANHUEZA, P. 2010. Diagnóstico Post Mortem de Scrapie mediante Inmunohistoquímica (IHQ) en tejido linfóide de mucosa rectal en ovinos. Memoria de título Médico Veterinario. Fac. Cs Vet y Pec., U. de Chile, Santiago de Chile. pp.17-73.

SCHNEIDER, K.; FANGERAU, H.; MICHAELSEN, B.; RAAB, W. 2008. The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull.* 77(6):343-55.

SCHALLER, O. 1996. *Nomenclatura Anatómica Veterinaria Ilustrada.* Zaragoza, Ed. Acribia. pp.614.

SISÓ, S.; GONZÁLEZ, L.; JEFFREY, M. 2010. Neuroinvasion in prion diseases: the roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010:747892.

SOTO, C. 2011. Prion hypothesis: the end of the controversy?. *Trends Biochem Sci.* 36(3):151-158.

TAMGÜNEY, G.; MILLER, M.; GILES, K.; LEMUS, A.; GLIDDEN, D.; DEARMOND, S.; PRUSINER, S. 2009. Transmission of scrapie and sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice expressing elk prion protein. *J Gen Virol.* 90:1035–1047.

TERRY, L.; HOWELLS, L.; BISHOP, K.; BAKER, C.; EVEREST, S.; THORNE, L.; MADDISON, B.; GOUGH, K. 2011. Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet Res.* 42:65.

ULVUND, M. 2007. Clinical findings in scrapie. **In:** Hörnlimann B, Riesner D, Kretzschmar H (eds) *Prions in human and animals.* Walter de Gruyter GmbH & CO KG, Berlin. pp.714.

ULVUND, M. 2008. Ovine scrapie disease: do we have to live with it?. *Small Rum Res.* 76:131–140.

VACCARI, G.; DI BARI, M.; MORELLI, L.; NONNO, R.; CHIAPPINI, B.; ANTONUCCI, G.; MARCON, S.; ESPOSITO, E.; FAZZI, P.; PALAZZINI, N.; TROIANO, P.; PETRELLA, A.; DI GUARDO, G.; AGRIMI, U. 2006. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J Gen Virol.* 87:1395–1402.

VACCARI, G.; PANAGIOTIDIS, C.; ACIN, C.; PELLETO, S.; BARILLET, F.; ACUTIS, P.; BOSSERS, A.; LANGEVELD, J.; VAN KEULEN, L.; SKLAVIADIS, T.; BADIOLA, J.; ANDREOLETTI, O.; GROSCHEP, M.; AGRIMI, U.; FOSTER, J.; GOLDMANN, W. 2009. State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet Res.* 40:48.

VAN KEULEN, L.; SCHREUDER, B.; VROMANS, M.; LANGEVELD, J.; SMITS, M. 2000. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl.* 16:57–71.

VAN KEULEN, L.; VROMANS, M.; DOLSTRA, C.; BOSSERS, A.; VAN ZIJDERVELD, F. 2008. TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res.* 39:24.

WADSWORTH, J.; DALMAU-MENA, I.; JOINER, S.; LINEHAN, J.; O'MALLEY, C.; POWELL, C.; BRANDNER, S.; ASANTE, E.; IRONSIDE, J.; HILTON, D.; COLLINGE, J. 2011. Effect of fixation on brain lymphoreticular vCJD prions and bioassay of key positive specimens from a retrospective vCJD prevalence study. *J Pathol.* 223(4):511-518.

WEISSMANN, C.; LI, J.; MAHAL, S.; BROWNING, S. 2011. Prions on the move. *EMBO. Rep.*12:1109–1117.

WESTAWAY, D.; GOODMAN, P.; MIRENDA, C.; MCKINLEY, M.; CARLSON, G.; PRUSINER, S. 1987. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell.* 51:651–662.

WESTERGARD, L.; CHRISTENSEN, H.; HARRIS, D. 2007. The Cellular Prion Protein (PrPC): Its Physiological Function and Role in Disease. *Biochim Biophys Acta.* 1771(6):629-644.

WHITFORD, D. 2005. *Proteins, Structure and Function.* John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, England. pp.55.

WOOD, J.; DONE, S.; PRITCHARD, G.; WOOLDRIDGE, M. 1992. Natural scrapie in goats: case histories and clinical signs. *Vet Rec.* 131:66–68.

WOOD, J.; MCGILL, I.; DONE, S.; BRADLEY, R. 1997. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982–1991. *Vet Rec.* 140:167–174.

WORLD BANK. 2011. *World livestock disease atlas: a quantitative analysis of global animal health data (2006-2009).* Washington, DC: World Bank. 1:104.

ZOU, W. 2013. Insoluble Cellular Prion Protein. . **In:** *Prions and Diseases: Volume 1, Physiology and Pathophysiology.* Springer. Nueva York, EEUU. pp.67-82.

ANEXOS

Anexo 1: Programa de procesamiento aplicado a muestras de óbex de caprinos para su posterior inclusión con parafina.

ESTACIÓN	REACTIVO	TEMPERATURA	DURACIÓN (min)
1	Alcohol 70°	Ambiente	120
2	Alcohol 90°	Ambiente-VAC	90
3	Alcohol 95° I	Ambiente-VAC	60
4	Alcohol 95° II	Ambiente-VAC	60
5	Alcohol 100° I	Ambiente-VAC	60
6	Alcohol 100° II	Ambiente-VAC	60
7	Alcohol 100° III	Ambiente-VAC	60
8	Xilol I	Ambiente-VAC	60
9	Xilol II	Ambiente-VAC	60
10	Xilol III	Ambiente-VAC	90
11	Parafina I	56-58° C	120
12	Parafina II	56-58° C	120

Anexo 2: Rehidratación de las muestras de óbex de caprinos para la tinción de Hematoxilina Eosina.

SOLVENTE	TIEMPO DE INCUBACIÓN (min)
Xilol I	3
Xilol II	3
Xilol III	5
Alcohol 100° I	3
Alcohol 100° II	3
Alcohol 95° I	3
Alcohol 95° II	3
Alcohol 70°	3
Agua Corriente	2 a 3

Anexo 3: Protocolo de Tinción Hematoxilina Eosina

BAÑO	TIEMPO DE INCUBACIÓN (min)
Hematoxilina Harris	5
Agua Corriente	5
Alcohol Acido 0,1%	segundos
Agua Corriente	10
Carbonato de Litio 1,5%	Hasta observar azulamiento (20'')
Agua Corriente	5
Eosina acuosa 2%	5
Alcohol 95°	segundos
Alcohol 100°	1
Alcohol 100°	2
Xilol I	2
Xilol II	2
Xilol III	2

Anexo 4: Clasificación de cortes histológicos como aptos o no aptos según tinción de H/E y cortes histológicos seleccionados para la técnica de IHQ.

MUESTRA	APTITUD	SELECCIONADOS
1	APTO	Seleccionado
2	APTO	Seleccionado
3	APTO	Seleccionado
4	APTO	Seleccionado
5	APTO	Seleccionado
6	APTO	Seleccionado
7	APTO	Seleccionado
8	APTO	Seleccionado
9	APTO	Seleccionado
10	APTO	Seleccionado
11	APTO	Seleccionado
12	APTO	Seleccionado
13	APTO	Seleccionado
14	APTO	Seleccionado
15	APTO	Seleccionado
16	APTO	Seleccionado
17	APTO	Seleccionado
18	APTO	Seleccionado
19	APTO	Seleccionado
20	APTO	Seleccionado

21	APTO	Seleccionado
22	APTO	Seleccionado
23	APTO	Seleccionado
24	APTO	Seleccionado
25	APTO	Seleccionado
26	APTO	Seleccionado
27	APTO	Seleccionado
28	APTO	Seleccionado
29	APTO	Seleccionado
30	APTO	Seleccionado
31	APTO	Seleccionado
32	APTO	Seleccionado
33	APTO	Seleccionado
34	APTO	Seleccionado
35	APTO	Seleccionado
36	APTO	Seleccionado
37	APTO	Seleccionado
38	APTO	Seleccionado
39	APTO	Seleccionado
40	APTO	Seleccionado
41	APTO	Seleccionado
42	APTO	Seleccionado
43	APTO	Seleccionado
44	APTO	Seleccionado
45	APTO	Seleccionado
46	APTO	Seleccionado
47	APTO	Seleccionado
48	APTO	Seleccionado
49	APTO	Seleccionado
50	APTO	Seleccionado

Anexo 5: Procedimiento aplicado para la rehidratación de las muestras de óbex de caprinos para la técnica de Inmunohistoquímica.

SOLVENTE	TIEMPO INCUBACION (min)
Xilol I	5
Xilol II	5
Alcohol 100° I	4
Alcohol 100° II	4
Alcohol 95°	3
Alcohol 80°	3