

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

“ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *PRNP* RELACIONADOS A LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA EN LA RAZA ABERDEEN ANGUS DE URUGUAY”

por

Rody Alberto ARTIGAS SILVA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección- Control y Tecnología de los Alimentos de Origen Animal.

MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Silvia Llambí.

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Alicia Postiglioni.

Tercer miembro:

Dra. Eileen Armstrong

Fecha:

Autores:

Rody Alberto ARTIGAS SILVA

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS Y GRÁFICOS	8
RESUMEN	9
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.	13
1.2. El comienzo de las investigaciones de las EETs.....	14
1.3. La aparición de las primeras EETs humanas.	18
1.4. La aparición de nuevas EETs en animales.	20
1.5. Camino hacia la determinación del agente infeccioso de las EETs.	21
1.6. Estructura y función de la PrP ^C	23
1.7. PRP ^{Sc} y su mecanismo de conversión.....	28
1.8. La Encefalopatía Espongiforme Bovina.....	32
1.8.1. <i>Una saga epidemiológica</i>	32
1.8.2. <i>Las formas clásica y atípica de la EEB. El fenómeno de cepas y el cuestionamiento al origen de la EEB</i>	37
1.8.3. <i>Encefalopatías espongiformes asociadas a la EEB</i>	41
1.9. Impacto económico y social de la EEB.....	44
1.10. Situación Actual de la EEB en el mundo	46
1.11. El gen <i>PRNP</i> Bovino. Estructura, regulación, variación y modulación de la enfermedad.	51
1.11.1. <i>Estructura y regulación del gen PRNP bovino</i>	51
1.11.2. <i>Variación del gen PRNP bovino y modulación de la enfermedad</i>	52
2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	56
3. HIPÓTESIS	57
4. OBJETIVOS	57
5. MATERIALES Y MÉTODOS	58
5.1. Material animal:	58
5.2. Análisis molecular:.....	58
5.3. Análisis genético-poblacional:	58
6. RESULTADOS	60
7. DISCUSIÓN	63
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	72
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por acompañarme durante toda la carrera y ser el motor que me impulsa día a día. No creo encontrar palabras suficientes para expresar lo mucho que valoro su constante apoyo y confianza.

A mis amigos, esa familia que se elige. Gracias por acompañarme en la vida, por brindarme su apoyo incondicional y darme ánimos, incluso en los momentos más difíciles de esta carrera. ¡No podrían imaginar cuánto los quiero!

A mi tutora, la Dra. Alicia Postiglioni, por su inigualable paciencia y guía. Siempre le estaré agradecido por abrirme las puertas del Área Genética y acompañar mi crecimiento durante tantos años. Espero haber colmado las expectativas.

A mis compañeros del Área Genética, un grupo humano excepcional. ¡Sin ellos el trabajo no sería tan divertido!

A la Facultad de Veterinaria y en ella, a la Universidad de la República, por haber forjado en mí el carácter universitario y permitirme alcanzar esta meta.

Sepan todos que mis logros también son suyos.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AAU:** Aberdeen Angus de Uruguay.
- **A β :** amiloide β .
- **A:** adenina.
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **APP:** proteína precursora de amiloide.
- **ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.
- **BR:** Brasil.
- **CAAE:** comité asesor de encefalopatías espongiformes.
- **C-EEB:** forma clásica de la Encefalopatía Espongiforme Bovina.
- **CH:** Suiza.
- **CN:** China.
- **CWD:** Enfermedad Debilitante Crónica de ciervos y alces.
- **DE:** Alemania.
- **Del:** delección.
- **E:** glutamina.
- **ECJ:** Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- **EEB:** Encefalopatía Espongiforme Bovina
- **EEF:** Encefalopatía Espongiforme Felina
- **EETs:** Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.
- **ETV:** Encefalopatía Transmisible del Visón.
- **Fis:** índice de fijación de Wright.
- **G:** glicina.
- **G:** guanina.
- **GPI:** dominio de anclaje glicosil fosfatidil inositol.
- **GPR126:** proteína G acoplada al receptor 126.
- **GSS:** Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- **H:** histidina.
- **HCH:** harina de carne y hueso.
- **He:** heterocigosidad esperada.
- **H-EEB:** forma atípica H de la EEB.
- **HDAC:** histona desacetilasa.
- **Ho:** heterocigosidad observada.
- **H-W:** Hardy-Weinberg.
- **PrP^C:** isoforma celular de la proteína prion.

- **EUE**: Encefalopatía Espongiforme de los Ungulados Exóticos.
- **IFF**: Síndrome de insomnio familiar fatal.
- **In**: inserción.
- **Indel**: polimorfismo de inserción o deleción.
- **ISO**: Organización Internacional de Normalización.
- **INAC**: Instituto Nacional de Carnes.
- **JP**: Japón.
- **K**: lisina.
- **kDa**: kilo Dalton.
- **Kpb**: kilo pares de bases.
- **KR**: Corea del Sur.
- **L-EEB**: forma atípica L de la EEB.
- **nvECJ**: nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
- **OIE**: Organización Mundial de Sanidad Animal.
- **P**: Prolina.
- **Pb**: pares de bases.
- **PL**: Polonia.
- **PRNP**: Gen codificante del prion.
- **PrP^{Sc}**: isoforma infecciosa de la proteína prion.
- **PrP***: isoforma intermedia de la proteína prion.
- **Q**: glutamina.
- **RP58**: proteína represora 58.
- **SNC**: sistema nervioso central.
- **SNP**: polimorfismo de nucleótido simple.
- **SP1**: proteína específica 1.
- **UE**: Unión Europea.
- **UK**: Reino Unido.
- **US**: Estados Unidos de América.
- **UY**: Uruguay.
- **W**: triptófano.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alteraciones histopatológicas observadas en encéfalos de individuos afectados por EETs en comparación a un control normal.....	14
Figura 2: Primer mención escrita al Scrapie.....	16
Figura 3: Microfotografías electrónicas de las varillas de prion asociadas a diferentes infecciones por priones.....	23
Figura 4: Esquema de la estructura primaria y terciaria e la PrP ^C incluyendo modificaciones postraduccionales.....	27
Figura 5: Esquema de la estructura tridimensional de PrP ^C y PrP ^{Sc}	28
Figura 6: Modelo de conversión inducida por molde.....	30
Figura 7: Modelo de nucleación y polimerización.....	31
Figura 8: Lesiones histopatológicas y varillas de prion en un caso de EEB.....	33
Figura 9: HCH producida (%) utilizando solventes hidrocarbonados entre 1964 y 1988.....	35
Figura 10: Distribución espacial de la incidencia de EEB entre 1986 y 1995.....	36
Figura 11: Casos diagnosticados de EEB entre 1989 y 2005 en Inglaterra y UE.....	37
Figura 12: Diferenciación de los tipos de EEB por Western Blot.....	39
Figura 13: Incidencia de la nvECJ en Reino Unido y otros países (Irlanda, Francia, Estados Unidos, Arabia Saudita, España, Italia, Japón, Países bajos, Canadá y Portugal) entre 1988 y octubre de 2006.....	44
Figura 14: Distribución de la EEB en el mundo.....	47

LISTA DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1: Países o zonas de países miembros de la OIE con riesgo insignificativo o controlado para la EEB según disposiciones del capítulo 11.4 del código terrestre..	48
Tabla 2: Números de casos de EEB comunicados por Reino Unido, desde su aparición a la última actualización disponible en la OIE	49
Tabla 3: Número de casos de EEB comunicados fuera de Reino Unido, desde 1989 hasta el 30/06/16	50
Tabla 4: Proporciones genotípicas y alélicas para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb del gen <i>PRNP</i> en bovinos Aberdeen Angus	60
Tabla 5: Heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), estadístico FIS y p-valor de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb en bovinos Aberdeen Angus.....	61
Tabla 6: Proporciones diplotípicas para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb del gen <i>PRNP</i> en bovinos Aberdeen Angus.	62
Tabla 7: Proporciones alélicas y genotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb en razas <i>Bos taurus</i>	66
Tabla 7 continuación: Proporciones alélicas y genotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb en razas <i>Bos taurus</i>	67
Tabla 8: Proporciones haplotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb del gen <i>PRNP</i> en razas <i>Bos taurus</i>	70
Tabla 8 continuación: Proporciones haplotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb en razas <i>Bos taurus</i>	71
Gráfico 1: Proporciones haplotípicas para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb en bovinos Aberdeen Angus.....	61

RESUMEN

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) tuvo su origen en Reino Unido en 1985, asociada al consumo de raciones elaboradas con harina de carne y hueso, un subproducto de la industria del “rendering”. Su asociación con la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob de los humanos (a partir del consumo de animales infectados) encendió una luz de alarma que ha transformado a la EEB en la enfermedad animal de mayor repercusión económica y social de la historia. El prion infeccioso (PrP^{Sc}) está codificado por el mismo gen cromosómico del huésped (gen *PRNP*) que el prión celular (PrP^{C}) y mecanismos postraduccionales estarían involucrados en la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} . Dos polimorfismos de tipo Inserción/delección -indel- en la región no codificante del gen *PRNP* bovino (23pb en el promotor y 12pb en el intrón 1) han demostrado estar asociados con la susceptibilidad a la enfermedad, siendo las deleciones más frecuentes en los animales susceptibles. En este trabajo se estudió la distribución poblacional de ambos polimorfismos indel en la raza Aberdeen Angus de Uruguay. Para esto, se seleccionaron 648 animales de ambos sexos, provenientes de diferentes líneas genéticas del banco de ADN del Área Genética, FVET-UdelaR. Las muestras fueron genotipadas por la empresa GeneSeek (US) mediante la técnica de espectrometría de masa. En base a los genotipos obtenidos se realizó un análisis genético-poblacional utilizando el software de libre acceso GENEPOP V4®. Se calcularon proporciones genotípicas, alélicas, haplotípicas y diplotípicas para ambos marcadores. Se evaluó el equilibrio génico de Hardy-Weinberg, se calcularon los índices de diversidad F_{IS} , H_O , H_E y se analizó el desequilibrio de ligamiento entre ambos marcadores (D'). Se observó para ambos polimorfismos una alta proporción de genotipos Del/Del así como una elevada proporción de los alelos de delección. Para ambos marcadores la población se encontró en equilibrio génico de Hardy-Weinberg. Los índices de diversidad media fueron similares a los reportados en esta misma población por otros autores. Al considerar la distribución de haplotipos, el haplotipo Del23 / Del12 (asociado a mayor susceptibilidad) fue el más abundante, seguido del haplotipo In23 / In12. Ambos marcadores demostraron estar fuertemente ligados. Concordante con la distribución haplotípica, el diplotipo Del23Del12 / Del23Del12 fue el más frecuente seguido de Del23Del12 / In23In12. La dinámica poblacional de ambos polimorfismos en la población Aberdeen Angus de Uruguay es

similar a la reportada para la raza en Brasil y Japón, así como en la mayoría de las razas *Bos taurus* estudiadas.

SUMMARY

Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) originated in the United Kingdom in 1986, associated with the consumption of rations made from meat-and-bone meal, a by-product of the rendering industry. Its association with the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease of humans (from the consumption of infected animals) ignited a warning light that has transformed BSE into the animal disease of greatest economic and social repercussion in history. The infectious prion (PrP^{Sc}) is encoded by the same chromosomal host gene (PRNP gene) as the cellular prion (PrP^{C}) and posttranslational mechanisms would be involved in the conversion of PrP^{C} into PrP^{Sc} . Two polymorphisms of type Insertion / deletion -indel- in the non-coding region of the bovine PRNP gene (23bp in the promoter and 12bp in intron 1) have been shown to be associated with susceptibility to the disease, with deletions being more frequent in susceptible animals. In this paper we studied the population distribution of both indel polymorphisms in the Aberdeen Angus breed of Uruguay. For this, 648 animals of both sexes were selected from different genetic lines of the DNA bank of the Genetic Area, FVET-UdelaR. The samples were genotyped by GeneSeek (EUA) using mass spectrometry technique. Based on the genotypes obtained, a genetic-population analysis was performed using the GENEPOP V4® free-access software. Genotypic, allelic, haplotypic and diplotypic proportions were calculated for both markers. The Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated, the FIS, HO, and HE diversity indices were calculated and the linkage disequilibrium between both markers (D') was analyzed. A high proportion of Del / Del genotypes was observed for both polymorphisms as well as a high proportion of the deletion alleles. For both markers the population was found in Hardy-Weinberg equilibrium. The average diversity indexes were similar to those reported in this same population by other authors. When considering the distribution of haplotypes, the Del23 / Del12 haplotype (associated with increased susceptibility) was the most abundant, followed by the In23 / In12 haplotype. Both markers showed to be strongly linked. In agreement with the haplotypic distribution, the Del23Del12 / Del23Del12 diplotypic was the most frequent followed by Del23Del12 / In23In12. The population dynamic of both polymorphisms in the Aberdeen Angus population of Uruguay is similar to that

reported for the breed in Brazil and Japan, as well as in most of the *Bos taurus* breeds studied.

1. INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías espongiformes transmisibles representan la más fascinante historia de todas las enfermedades neurológicas, casi como una película de ciencia ficción. Epidemias de locura en animales domésticos que aparecen y desaparecen en el tiempo. Aborígenes caníbales de selvas tropicales, desafíos inimaginables a los conceptos básicos de la biología, premios Nobel entregados o en vías de entregarse e incluso injustamente denegados, insomnios imposibles de controlar que producen la muerte y un sin número de acontecimientos sorprendentes que dificultan, muchas veces, aplicar la lógica en un intento de predecir el futuro acerca de estas enfermedades. Resumir estos eventos, no es tarea para nada sencilla.

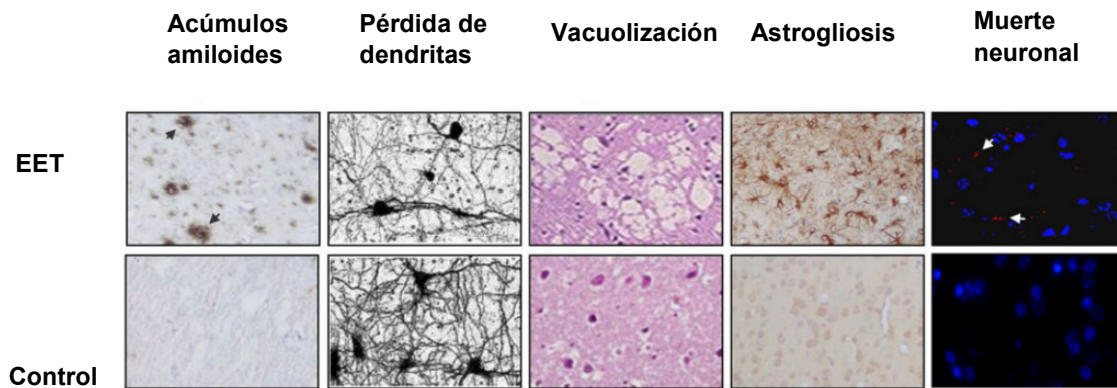
1.1. Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), conocidas también como enfermedades priónicas o prionopatías, constituyen una familia de trastornos neurológicos lentamente progresivos, caracterizados por degeneración y vacuolización del tejido cerebral. Afectan tanto a animales como al hombre, y comparten varias características en común.

En humanos se reconocen cinco EETs: la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ: en sus formas típica, atípica, iatrogénica y familiar), el Kurú (en la tribu Fore de Papúa Nueva Guinea asociado a canibalismo ritual), el Síndrome de Insomnio Familiar Fatal (IFF), el Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), y la nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (nvECJ). En animales se han descrito: el Scrapie de ovinos, caprinos y muflones, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF), la Encefalopatía Espongiforme de los Ungulados Exóticos (EUE), la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV) y la Enfermedad Debilitante Crónica de ciervos y alces (CWD). Todos estos desórdenes presentan un largo periodo de incubación, que puede ir desde algunos meses hasta varios años. La sintomatología varía poco de una enfermedad a otra, siendo el deterioro motor, el deterioro cognitivo y la ataxia cerebral, los signos más característicos. Una vez que la enfermedad se manifiesta, la evolución clínica es rápida y la muerte sobreviene inevitablemente a los pocos meses (Aguilar-Calvo y col., 2015).

El estudio histopatológico del encéfalo de los individuos afectados, muestra lesiones vacuolares que le dan un característico aspecto esponjiforme producto de una acumulación amiloide, pérdida de dendritas, astrogliosis y muerte neuronal (figura 1). Estas observaciones son imprescindibles para el diagnóstico de la enfermedad (Soto y Satani, 2011).

Figura 1. Alteraciones histopatológicas observadas en encéfalos de individuos afectados por EETs en comparación a un control normal.



De izquierda a derecha, la imagen muestra acúmulos amiloides evidenciados por inmunohistoquímica. Pérdida de dendritas. Vacuolización o degeneración esponjiforme evidenciada tras la tinción con hematoxilina-eosina. Atrogliosis, observada por inmunohistoquímica específica para astrocitos reactivos. Muerte neuronal evidenciada con anticuerpos anti-caspasa 3 (células en rojo) y contra tinción de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol). Las fotos de la fila superior corresponden a individuos afectados de EETs y la fila inferior controles normales. (Modificado de Soto y Satani, 2011).

1.2. El comienzo de las investigaciones de las EETs.

Durante el siglo XVIII, Inglaterra se establecía como una potencia mercantil en Europa. La lana era uno de sus principales productos e involucraba a un cuarto de su población. Con la revolución agrícola en su apogeo, la invención de la hilandería y el inminente ingreso del vapor como fuente de energía, pronto el tejido dejaría de ser un proceso artesanal para convertirse en uno mecanizado (Brown, P. y Bradley, R., 1998). En este contexto, no es de extrañar una proclama presentada al parlamento inglés en el año 1732 por pastores del área de Lincolnshire, a raíz de

una oveja de raza Merino responsable de una extraña y fatal enfermedad (presumiblemente Scrapie) que se extendía rápidamente, con consecuencias económicas devastadoras (Liberski, 2012; Brown y Bradley, 1998). La procedencia española del animal llevó a que los pastores solicitaran la incorporación de mayores regulaciones por parte del estado en el movimiento de animales, siendo esta la primer mención documentada acerca de una EET de la historia (Liberski, 2012).

Schneider y col., (2008) en un estudio retrospectivo de las publicaciones acerca del Scrapie, lograron trazar la primer referencia explícita a esa EET al año 1750, donde Johann George Leopoldt realizó una descripción de la enfermedad, dejando claro el carácter “contagioso” del problema (figura 2). A este documento aún puede accederse, dado el gran valor histórico que ostenta (<http://digitale.bibliothek.uni-halle.de/vd18/id/7670817> consultado el 07/03/17).

Si bien la enfermedad era conocida por los pastores y sus empleadores desde varios años atrás, los casos eran mantenidos en secreto por miedo a repercusiones económicas negativas, esto hizo que la enfermedad fuera desconocida por gran tiempo para los veterinarios (Schneider y col., 2008). A partir del primer reporte, fueron apareciendo informes de carácter científico-técnicos que se ocupaban del Scrapie. El primero fue publicado anónimamente en la *Agricultural Society of Bath* (actualmente denominada *Bath and West Society*, <http://www.bathandwestsociety.com/>) en 1788. Años más tarde, en 1811, Thomas Davies publicó un trabajo en el *General View of the Agriculture of Wiltshire*, en el que dedicó un párrafo a describir el Scrapie y lo relacionó con aquellos brotes documentados en Lincolnshire, 80 años antes (Liberski, 2012).

Figura 2. Primer mención escrita al Scrapie (modificado de Schneider y col., 2008)

**Von denen mancherley Krankheiten des Schaafviehes,
und was vor Curen damit vorgenommen werden.**

Der Trab ist auch eine Krankheit der Schaaf, und ist ansteckend. Es bekommen auch manche Schaaf den Trab, welches eine Krankheit ist, die daran zu erkennen, wenn sich das Stüde, das solchen bekommt, niederleget, und beißet mit dem Maule an den Füßen und um die Beine, und reiben sich mit dem Kreuze an denen Stangen, verlieren das Gedeyen, fressen auch nicht recht, und verlahmen endlich; sie schleppen sich lange, verzehren sich nach und nach, und zuletzt müssen sie sterben. Welches Vieh diese Staupe bekommt, wird nicht besser. Daher denn das allerbeste ist, daß ein Schäfer, welcher ein Stüde von dem Trabe befallen, gewahr wird, es balde wegschafft, und vors Herrschaftliche Gesinde schlachtet. Es muß ein Schäfer ein solches Stüde Vieh also gleich von dem gesunden Vieh absondern, denn es steckt an, und kan vielen Schaden unter der Heerde verursachen.

Fuente: Johann George Leopoldt (1750): Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Land-Wirthschafft, Parte 5, Capitulo 12, p.348. Soran (118).

Por su importancia histórica, el texto se reproducirá en español:

*Sobre las diversas enfermedades de las ovejas
y los tratamientos que se aplican.*

Ocasionalmente, algunas ovejas contraen Scrapie, una enfermedad reconocible por el decúbito del animal. Se mordisquea las pezuñas y las patas, y se rasca la espalda contra los postes. Deja de prosperar, pierde el apetito y finalmente se cansa. Se arrastran por un largo tiempo, se consumen más y más, y al final, están condenados a la muerte. Los animales que contraen esta enfermedad no se recuperan. Lo mejor que un pastor puede hacer en caso de detectar un animal enfermo con Scrapie, es separarlo y sacrificarlo para apartarlo inmediatamente del rebaño saludable, ya que esta enfermedad es contagiosa y puede causar un gran daño al rebaño.

Desde mediados del siglo XIX comenzaron a surgir diferentes teorías acerca del origen del Scrapie: en 1848 Roche-Lublin atribuía la enfermedad a la hiperactividad sexual de las majadas o a los relámpagos (Pattison, 1972). En 1899 Besnoit y Morel en la Escuela Veterinaria de Toulouse, Francia, observaron por primera vez la vacuolización neuronal como una característica distintiva de la enfermedad. Si bien intentaron reproducirla en ovejas sanas mediante la inoculación de homogeneizados de encéfalos y transfusiones sanguíneas de animales enfermos, así como manteniendo las ovejas sanas con las enfermas, los animales sanos no mostraron síntomas en los meses siguientes a los experimentos. Sin embargo, su teoría apuntaba directamente a la presencia de un agente infeccioso (Liberski, 2012; Brown y Bradley, 1998; Pattison, 1972). La comunidad científica de la época continuaba buscando el agente causal de la enfermedad, surgiendo otras teorías como la de M`Gowan en 1912, quien asociaba al Scrapie con el parásito intracelular *Sarcosporidium* (Liberski, 2012).

Uno de los avances más importantes en el campo de las EETs en su conjunto se dio en 1936, cuando Cuille y Chelle inocularon intraocularmente homogeneizados de médula espinal de ovejas infectadas (tratados con filtros de exclusión bacteriana Chamberland L3) a ovejas sanas, las que 14 a 22 meses después desarrollaron Scrapie (Eraña, 2015; Liberski, 2012; Schneider y col., 2008; Brown y Bradley, 1998; Pattison, 1972). Todo esto reavivó el interés por la enfermedad al comprobar su naturaleza infecciosa y el atípico periodo de incubación. Probablemente, el mismo diseño experimental llevado a cabo años antes por Besnoit y Morel fracasó al no realizar un seguimiento más prolongado de los animales inoculados. Los trabajos posteriores de William Gordon (subdirector del prestigioso Instituto Moredum de Edimburgo, Escocia) en el año 1938, lograron reproducir los experimentos de Cuille y Chelle a gran escala, infectando a 697 ovejas de las cuales 200 desarrollaron Scrapie (Liberski, 2012). Además, de forma inadvertida, provocó un brote de la enfermedad en Inglaterra, al vacunar con una vacuna inactivada con formalina contra Louping ill (Encefalomielitis ovina), preparada con encéfalo, medula espinal y bazo de una oveja, que posteriormente se comprobó que estuvo expuesta a infección natural por Scrapie (Brown y Bradley, 1998; Pattison, 1965).

El advenimiento de la II Guerra Mundial puso un freno en las investigaciones sobre Scrapie en la mayor parte del mundo, a excepción de los trabajos realizados por D. R. Wilson en el Instituto Moredum. Sus contribuciones a la investigación de las EETs resultaron invaluable, aunque poco reconocidas. Logró reproducir la enfermedad tras 9 pasajes sucesivos, sustentando definitivamente la naturaleza infecciosa del Scrapie. Demostró, además, la atípica resistencia del agente frente a la formalina, formol, cloroformo y a las altas temperaturas (100 °. C por 30 min) (Pattison, 1972).

1.3. La aparición de las primeras EETs humanas.

Durante el comienzo del siglo XX se documentaron los primeros casos de enfermedades priónicas en humanos. Entre los años 1920 y 1923, varios casos de una rara enfermedad neurológica, distinta a todas las documentadas a la fecha y con un curso clínico rápido, fueron dadas a conocer a la comunidad científica por los neurólogos alemanes Hans Gerard Creutzfeldt y Adolf Jacob de quienes recibe su nombre (Eraña, 2015). El caso más representativo de ECJ fue el de Auguste Hoffman, una mujer de 38 años fallecida en enero de 1922 en un estado de demencia profunda de 14 meses de duración. Los signos clínicos incluían trastorno mental, disartria, mioclonias y deterioro motor progresivo. Jacob mencionaba en su descripción histopatológica la presencia de degeneración vacuolar en la corteza cerebral, proliferación astrocítica y degeneración neuronal (Polo, 2000). Desde esas primeras descripciones, en los años siguientes aparecieron otros casos de enfermedades neurodegenerativas, muchos de los cuales fueron equivocadamente clasificados como ECJ. En contraparte, muchos casos de ECJ fueron publicados bajo otras denominaciones como: pseudoesclerosis espástica, degeneración cortico-palido-espinal, degeneración cortico-estriato-espinal, encefalopatía vascular aguda, encefalomielopatía diseminada, encefalopatía subaguda progresiva, síndrome de Jacob y atrofia presenil espongiosa subaguda; lo que refleja la intensa controversia y confusión que rodeaban a la enfermedad en esa época (Eraña, 2015). Cabe agregar que en 1936, los clínicos Gerstman, Stsüssler y Scheinker describieron una familia con varios integrantes fallecidos con ataxia cerebelosa y demencia progresiva (Polo, 2000). Años más tarde, esta enfermedad sería reconocida como un integrante más del grupo de las EETs humanas, en la forma de un síndrome completamente diferenciado de la ECJ (Eraña, 2015).

Hacia finales de octubre de 1956, el médico alemán Vincent Zigas, desempeñándose en el rol de médico oficial para el Departamento de Salud Pública del Territorio de Papúa y Nueva Guinea, comenzó su investigación acerca de una enfermedad desconocida que asolaba a la tribu indígena *fore* de la región Moke, en el interior inexplorado de las tierras altas (Polo, 2000). El Kuru, como denominaban los indígenas a la enfermedad, afectaba con preferencia a mujeres y niños, produciendo temblores progresivos, ataxia cerebelosa, deterioro neurológico profundo y muerte al cabo de un año. Esa enfermedad atrajo rápidamente la atención del Dr. Carleton Gajdusek, quien tuvo un papel decisivo en la investigación de las enfermedades priónicas. Gajdusek y Zigas apuntaron en un principio a un desorden genético, pero pronto se enfocaron en una naturaleza infecciosa fuertemente asociada con el canibalismo (ritual funerario que solía practicar esa tribu) como vehículo de transmisión para el agente (Libersky, 2012). En 1957 Igor Klatzo, trabajando con 6 encéfalos de pacientes fallecidos de Kuru, estableció por primera vez la relación entre dos EETs humanas, al comparar histopatológicamente las lesiones producidas por Kuru con las producidas por ECJ (Polo, 2000). Dos años más tarde el patólogo veterinario William Hadlow, en una carta publicada en *The Lancet*, puso en relación al Kuru con el Scrapie, y en vista de los avances logrados por los veterinarios Cuille y Chelle propuso: ...“podría ser interesante, a la vista de la experiencia veterinaria, plantearse la posibilidad de intentar la transmisión experimental del Kuru a primates de laboratorio, pues se podría suponer que los mecanismos patogénicos involucrados en el Scrapie, por inusuales que sean, es poco probable que sean únicos en la patología animal”... (Pattison, 1972). Siguiendo esta observación, Gajdusek logra la transmisión de Kuru a 3 chimpancés en 1965, y posteriormente, el pasaje de la enfermedad de esos tres a otros siete (Gajdusek y col., 1967). Los trabajos de Gajdusek le valieron el Premio Nobel de Medicina en 1976 y, aún hoy en día, muchos se plantean el motivo por el cual Hadlow no compartió con él el premio (Polo, 2000). De esta forma, la historia de investigación de las EETs debe uno de sus principales avances a una exquisita cadena de observaciones por parte de clínicos y patólogos, tanto humanos como veterinarios.

Los años 70` ingresaron a la historia de las EETs con hallazgos escalofriantes para la comunidad científica y el mundo, la ECJ podía transmitirse de forma iatrogénica. En una publicación de 1974, se describió el primer caso de una mujer fallecida por

ECJ dos años después de recibir un implante de córnea de un donante masculino, en el que posteriormente pudo demostrarse la enfermedad (Duffy y col., 1974). Si bien la evidencia de la transmisibilidad de estas dos enfermedades humanas fue un hecho relevante, la identificación concreta del agente aún permanecía sin esclarecer; mientras nuevas EETs continuaron surgiendo en animales y el hombre.

1.4. La aparición de nuevas EETs en animales.

Durante el periodo en que la atención científica estuvo centrada en las enfermedades priónicas humanas, la patología veterinaria sumó dos nuevas enfermedades al grupo de las EETs. En 1947 se describió en una granja de cría de visones del estado de Wisconsin (US), la encefalopatía transmisible del visón (Eckroade y col., 1973) con el último brote identificado para ese país en 1985 (Marsh y col., 1991). La enfermedad se diagnosticó también en sitios distantes como: Canada, Europa, Rusia y países escandinavos (Marsh y Hadlow, 1992). Se trataba de una enfermedad debilitante, con cambios en el comportamiento, al comienzo sutiles, seguidos de signos neurológicos como dificultad para alimentarse, incoordinación, rodeos, hiperexcitabilidad, agresividad, mordida compulsiva, “cola de ardilla” (levantada sobre la espalda), automutilación (principalmente de la cola), decúbito, letargia, convulsiones y muerte al cabo de 2 a 8 semanas. El origen de los brotes nunca pudo establecerse, sin embargo, se presume que el agente infeccioso pudo transmitirse por los alimentos al comprobarse dentro de EEUU que todos los establecimientos compartían la misma fuente de alimentación (Marsh y Hadlow, 1992).

En 1967 se describió por primera vez en una población cautiva de ciervos mula (*Odocoileus hemionus hemionus*) en Fort Collins- Colorado, la Enfermedad Debilitante Crónica de ciervos y alces, aunque su asignación al grupo de las EETs no ocurrió hasta 1978 (Williams y Young, 1980). Desde ese momento, la enfermedad se ha vuelto endémica en gran parte de Norteamérica (21 estados de los 50 que forman el país) (Edmunds y col., 2016). Afecta a varias especies de ungulados domésticos y silvestres, causando drásticas reducciones en las poblaciones naturales de diferentes especies de cérvidos (Uehlinger y col., 2016). El

origen y los mecanismos de transmisión del agente infeccioso aún continúan sin esclarecerse por completo. La enfermedad se caracteriza clínicamente por pérdida de peso crónico, que lleva invariablemente a la muerte de los animales afectados (Aguilar-Calvo y col., 2015).

En pocos años, la ciencia sumó a la familia de las EETs varias entidades nosológicas, alcanzando grandes avances en su estudio que dejaron en evidencia su peculiar naturaleza. Sin embargo, el agente etiológico continuaba sin identificarse y no se esclarecería hasta ya entrados los años 80`.

1.5. Camino hacia la determinación del agente infeccioso de las EETs.

En vista de los avances científicos logrados en la época, era claro que las EETs respondían a un agente de naturaleza infecciosa con un periodo de incubación inusualmente prolongado. Ya en 1954, Sigurdsson postuló que el agente etiológico del Scrapie correspondía a un “virus lento” (Schneider y col., 2008), teoría que dominó el campo científico durante varios años. Sin embargo, la increíble resistencia del agente frente a tratamientos fisicoquímicos que inactivan virus, como la formalina y la temperatura, demostrado anteriormente por Gordon y Wilson y luego por Pattison, no daban apoyo a esa teoría (Pattison, 1965). La imposibilidad de aislar el virus, sumado a la ausencia de anticuerpos específicos, a la extraordinaria resistencia del patógeno frente a nucleasas y a las radiaciones ionizante y ultravioleta, hizo que la teoría de un virus lento fuera perdiendo adeptos, suponiendo que el agente podía multiplicarse en el nuevo huésped sin que su estructura estuviese ligada a ningún ácido nucleico (Alper, 1972; Alper y col., 1966). Desde entonces otras teorías surgieron, postulando primero que podría tratarse de un polisacárido (Alper y col., 1966; Field, 1966) o lípido (Alper y col., 1978). En 1967, por primera vez la hipótesis de una proteína fue enunciada por Griffith, seguida en 1970 por la teoría del virino (revisado en Fast y Groschup, 2013).

Trabajando sobre la hipótesis de Griffith, durante gran parte de los años 80, Stanley Prusiner propuso el término prion (acrónimo del inglés *Proteinaceous Infectious Particle*) para denominar al agente que producía el Scrapie (Prusiner, 1982). De forma casi simultánea, Patricia Merz y col. (1981) y Prusiner y col. (1983) publicaron

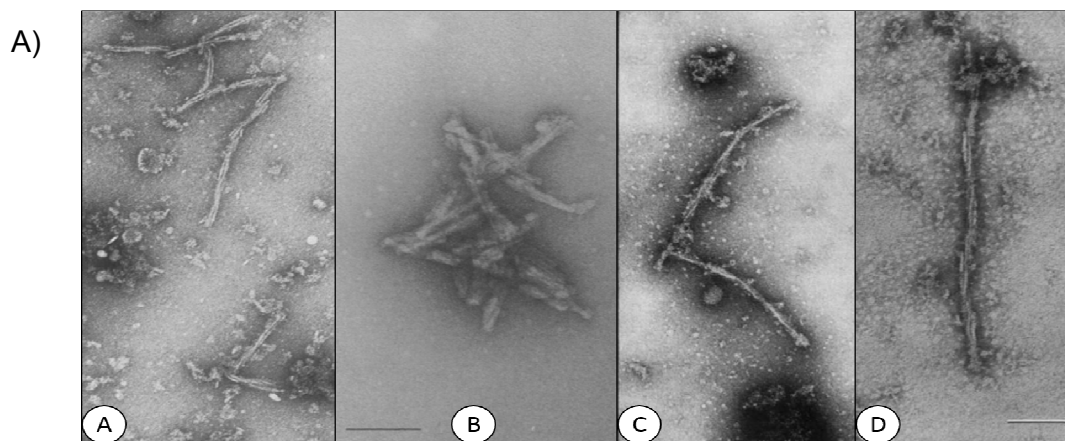
la primer evidencia morfológica del agente causal, primero del Scrapie y más tarde de la ECJ. Mediante tinción negativa en microscopía electrónica, ambos observaron estructuras fibrilares anómalas en encéfalos de individuos afectados (figura 3), con la salvedad de que Merz las atribuyó erróneamente a virus filamentosos, mientras que Prusiner a varillas de prion. En este aspecto, Prusiner justificó su presencia por un acúmulo amiloide y finalmente logró aislar la proteína prión (PrP) partiendo de lisados de encéfalos homogeneizados (Prusiner y col., 1983).

Los priones purificados de cerebros de hámster inoculados con Scrapie, al ser sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida mostraban una banda única de 27-30 kDa, razón por la cual la proteína fue denominada PrP²⁷⁻³⁰ o PrP^{Sc} (isoforma PrP scrapie, por su asociación con la enfermedad) (Prusiner y col., 1983). El aislamiento de la proteína y la determinación de la secuencia del extremo amino terminal por parte del grupo de trabajo de Prusiner, le permitió a Oesch y col., (1985) determinar que PrP^{Sc} estaba codificada por un gen de copia única del huésped y que derivaba de una proteína de tamaño mayor, en el entorno de los 33-35 kDa. Los trabajos posteriores realizados por el mismo autor lograron identificar el gen cromosómico (*PRNP*) y su ARNm (ARN mensajero) y probaron que su expresión se daba de forma constitutiva en diferentes tejidos corporales, incluido el cerebral. Así mismo, demostraron que PrP^{Sc} y la PrP descubierta en animales sanos llamada PrP^C (isoforma celular normal) estaban codificadas por el mismo gen y que la formación de PrP^{Sc} podrían ser explicada por mecanismos postraduccionales (Basler y col., 1986; Eraña, 2015).

Todos estos descubrimientos culminaron en lo que se conoce como la hipótesis de “solo proteína”, en la que se propone que la PrP^{Sc} es el único componente del agente infeccioso de las enfermedades priónicas y cuya propagación no está vinculada a ningún ácido nucleico específico.

En 1997, por segunda vez en la historia, se otorga un Premio Nobel de Medicina al campo de las EETs. Esta vez a Stanley Prusiner en reconocimiento a sus trabajos que permitieron dilucidar la extraña naturaleza del agente infeccioso.

Figura 3. Microfotografías electrónicas de las varillas de prion asociadas a diferentes infecciones por priones.



Muestra de encéfalo de ratón inoculado con cepa 139A de Scrapie. Aumento 68400X (modificado de Merz y col., 1981). B) Muestra de encéfalo de hámster inoculado con cepa de Scrapie adaptada a Hamster (modificado de Prusiner y col., 1983). C) Muestra de encéfalo de paciente humano con ECJ. Aumento 133000 y D) Muestra de encéfalo de ovino afectado por Scrapie. Aumento 133000 (modificados de Merz y col., 1983). La barra indica 100 nm. A, C y D tinción negativa con ác. fosfotungstico de sodio, B) tinción negativa con formato de uranilo.

1.6. Estructura y función de la PrP^C

La PrP^C es una sialoglicoproteína monomérica soluble, altamente conservada, de aproximadamente 250 aminoácidos en su precursor proteico (Castle y Gill, 2017) que es codificada por el gen *PRNP* (cuya estructura, expresión y regulación serán abordados más adelante en esta tesis) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=prion+protein>). La PrP^C presenta pequeñas variaciones para cada especie de mamífero, pero todas con una señal peptídica de secreción en el extremo amino terminal que la dirige a la membrana plasmática y que es eliminada durante su procesamiento (Eraña, 2015). Su expresión comienza temprano durante el desarrollo, detectándose en embriones de ratón en todo el tubo neural y células indiferenciadas al día 13,5 (Manson y col., 1992) y en la sustancia gris de la médula espinal de embriones de pollo al día 6 (Harris y col., 1993). En embriones bovinos puede detectarse al día 27, con un aumento de la transcripción del gen *PRNP* ya desde el día 4 (Peralta y col., 2016).

En el adulto, se trata de una proteína ubicua, presente prácticamente en todo el organismo, con abundancia específica en el sistema nervioso central, particularmente a nivel neuronal (Zomosa-Signoret y col., 2007).

La síntesis de PrP^C comienza a nivel del retículo endoplásmico y es enviada a través del aparato de Golgi a la membrana celular a la que se une por medio de un dominio de anclaje glicosil fosfatidil inositol (GPI) en pequeñas regiones denominadas balsas lipídicas (Vey y col., 1996; Stahl y col., 1987). Curiosamente, no toda la PrP^C se encuentra en la superficie de la célula. La proteína parece estar sujeta a ciclos de internalización y regreso a la membrana celular a través de un proceso de reciclaje endosómico (Sunyach y col., 2003), que permitiría un control estricto del pool de PrP^C en la superficie celular (Castle y Gill, 2017). Además existen reportes de PrP^C a nivel del núcleo (Bravard y col., 2015) y de las mitocondrias (Faris y col., 2017). La PrP^C humana ha sido profundamente estudiada y dado su alto nivel de conservación entre los mamíferos se la establece como modelo estructural. Se organiza en dos dominios claramente definidos en la resonancia magnética nuclear (Ver figura 4A). El extremo amino terminal de la proteína madura (aminoácidos 23-121) forma un dominio poco estructurado y flexible, en cambio el extremo carboxilo terminal (aminoácidos 136-231) forma un dominio organizado y globular (Zahn y col., 2003; Riek y col., 1997). A modo descriptivo la estructura primaria de la PrP^C puede dividirse en cinco regiones en base a sus principales componentes, que modificando el esquema conceptual propuesto por Pastraña (2008) son:

- 1) Región 1-22: péptido señal que es escindido durante el proceso de biosíntesis (Aguzzi y Calella, 2009).
- 2) Región 23-110: contiene una zona con repeticiones de octapéptidos (principalmente los repetidos PHGGGWGQ y PQGGGWGQ) entre el aminoácido 51 y 91, flanqueada por dos pequeños clusters cargados positivamente conocidos como CC1 (aa 23-27) y CC2 (aa 95-110). La región de octapéptidos es el segmento más conservado de la proteína en los mamíferos (Zahn, 2003) y al que se le ha atribuido un rol fundamental en su función biológica, puesto que inserciones de repeticiones se han asociado a casos esporádicos de ECJ (Sanchez-Valle y col., 2012; Pietrini y col., 2003),

así como a casos de síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (Vital y col., 2011).

- 3) Región 111-135: Contiene una zona hidrofóbica, denominada HC (aa 111-134) que separa el dominio desestructurado del dominio globular (Aguzzi y col., 2008) y que podría estar relacionada con los procesos de dimerización de la PrP^C (Ramblond y col., 2008)
- 4) Región 136-231: Contiene 2 sitios de N-glicosilación en las asparaginas Asn-181 y Asn-197 en el humano y Asn-180 y Asn-196 en el ratón (Aguzzi y Calella, 2009). Durante la síntesis, en su pasaje por el aparato de Golgi se adicionan dos, uno o ningún grupo glicosil en esas asparaginas, generando las especies diglicosiladas, monoglicosiladas o desglicosiladas de la PrP^C. El significado biológico de estas glicosilaciones es desconocido, sin embargo las diferentes proporciones entre las tres formas se utilizan para distinguir y caracterizar las diferentes cepas priónicas. Dentro de esta región, la presencia de una cisteína en posición 179 y otra en posición 214 permite la formación de un único puente disulfuro (Aguzzi y Callela, 2009).
- 5) Región 232-254: contiene la secuencia hidrofóbica carboxilo terminal que es eliminada durante la maduración de la proteína y sirve a modo de péptido señal para la unión del anclaje GPI en la serina 231 (Pastraña, 2008).

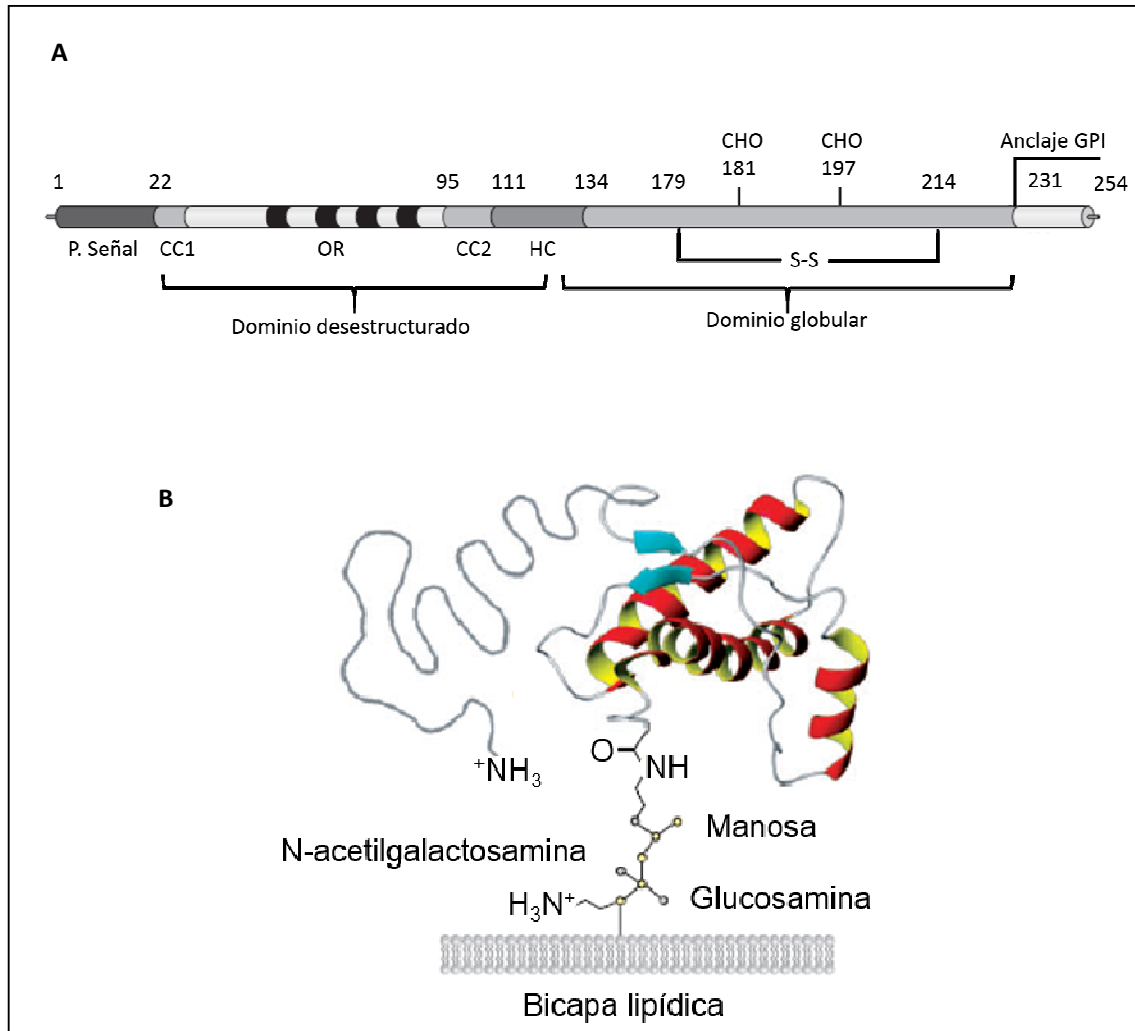
La estructura terciaria de la PrP^C está formada por tres hélices α largas ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) que representan el 42% de la proteína y 2 hojas β antiparalelas cortas (3% de la proteína) que se unen a través de cuatro lazos, formando así gran parte del dominio globular (Pan y col., 1993; Riek y col., 1997; Haire y col., 2004). Las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ se encuentran conectadas por medio del puente disulfuro y el dominio desestructurado se observa a modo de cola flexible (Aguzzi y col., 2008) (Ver figura 4B).

A pesar del vasto conocimiento que se tiene acerca de la estructura de la PrP^C su rol fisiológico continúa siendo desconocido. Algunas de las funciones que se le han atribuido incluyen: protección celular frente al stress oxidativo y antiapoptosis, adhesión celular, desarrollo de neuritas, excitabilidad neuronal, citotoxicidad,

funciones en el sistema inmune, mantenimiento del ritmo circadiano, homeostasis de iones metálicos (particularmente el cobre) y homeostasis mitocondrial (Nicolas y col., 2009; Biasini y col., 2012; Halliez y col., 2014; Castle y Gill, 2017), aunque son necesarias más investigaciones que den sustento a estas observaciones. A pesar de esto, algunas funciones cuentan con claras evidencias que las respaldan. Bremer y col., (2010) y posteriormente Nuvolone y col., (2016) demostraron que ratones Knock Out para el gen *PRNP* desarrollaban una neuropatía desmielinizante periférica, atribuyéndole a la PrP^C la función de mantenimiento de la mielina. Trabajos recientes han demostrado que la PrP^C promovería ese mantenimiento a través de la interacción de una región del extremo N-terminal (residuos 23-33) con la proteína GPR126 (proteína G acoplada a receptor 126) en la superficie de las células de Schwann (Kuffer y col., 2016), sin embargo el mecanismo exacto aún permanece inconcluso.

Luego de su síntesis muchas proteínas necesitan ser procesadas para poder cumplir su función biológica. Tal es el caso de la APP (proteína precursora de amiloide) que puede sufrir diferentes cortes o clivajes. El clivaje β realizado por la enzima beta-secretasa 1 libera un fragmento denominado sAPP β que luego de ser procesado por una gama-secretasa produce el péptido amiloide β (A β). Se ha observado que el A β se acumula en el encéfalo de pacientes con Alzheimer, por lo que se le ha atribuido un rol fundamental en el desarrollo de la enfermedad. En este aspecto, se ha determinado en algunos experimentos que la PrP^C actúa como un inhibidor para la beta-secretasa 1 reduciendo la acumulación de A β . Por este motivo también se le atribuiría una función única de protección frente al Alzheimer (Parking y col., 2007; Whitehouse y col., 2013), sin embargo otros estudios deben ser realizados dados algunos resultados contradictorios (McHugh y col., 2012; WhiteHouse y col., 2016).

Figura 4. Esquema de la estructura primaria y terciaria de la PrP^C incluyendo modificaciones postraduccionales.



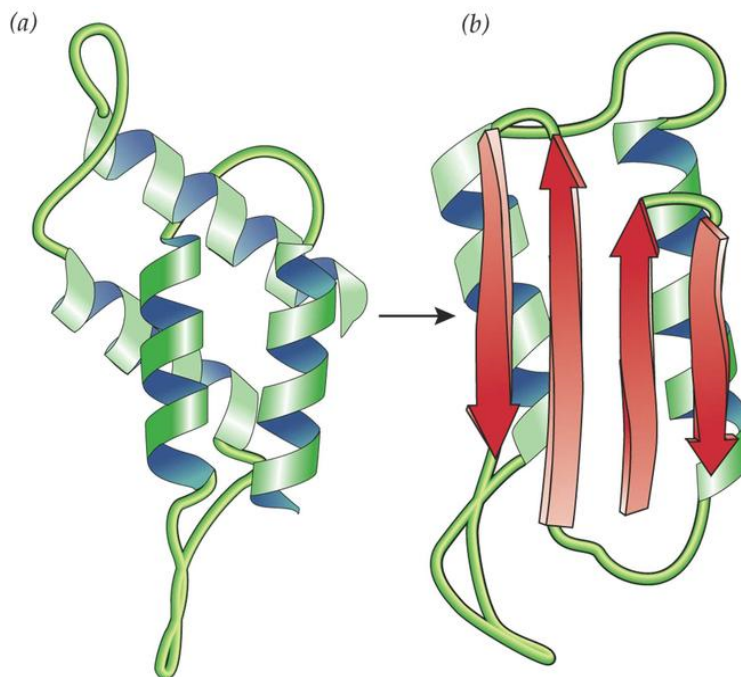
A) Estructura primaria sonde P. señal: péptido señal; CC1 y CC2: clusters cargados positivamente; OR: repetición de octapéptidos; HC: región hidrofóbica; S-S: puente disulfuro; CHO: sitios de glicosilación. Los números indican la posición relativa al aminoácido. Modificado de Aguzzi y Calella (2009).

B) Estructura terciaria inferida por resonancia magnética nuclear. Se muestra a la PrP^C anclada a una bicapa lipídica por medio de GPI. Hélices α en color rojo y hojas β en azul. Modificado de Aguzzi y col. (2008).

1.7. PrP^{Sc} y su mecanismo de conversión.

La PrP^{Sc} es una isoforma de la PrP^C, ambas presentan la misma secuencia aminoacídica pero con diferencias en su estructura tridimensional (Biasini y col., 2012). En contraste a la PrP^C el contenido de hojas β en la PrP^{Sc} es mayoritario (40%) en relación al de hélices α (30%) (Ver figura 5) (Aguzzi y Calella, 2009). Estos datos sugieren que la conversión de hélices α a hojas β es un evento fundamental para la formación de PrP^{Sc} y la propagación de las enfermedades priónicas.

Figura 5. Esquema de la estructura tridimensional de PrP^C y PrP^{Sc}



(a) PrP^C: obsérvese en azul el predominio de hélices α . (b) PrP^{Sc}: obsérvese en rojo el predominio de hojas β . Tomado de http://www.bio.miami.edu/tom/courses/bil255/bil255goods/03_proteins.html, consultado 01/08/17.

La necesidad de una PrP^C funcional en la fisiopatología de la enfermedad fue establecida por Brandner y col., (1996) en uno de los experimentos más elegantes que se han realizado acerca del tema. Estos autores demuestran que el implante de injertos que expresan PrP^C en el cerebro de ratones Knock Out para el gen *PRNP*, es la única región de todo el encéfalo que desarrolla neurotoxicidad una vez que los

animales son infectados. Por lo tanto, la proteína PrP^C actuaría como un mediador de la neurotoxicidad para las enfermedades priónicas.

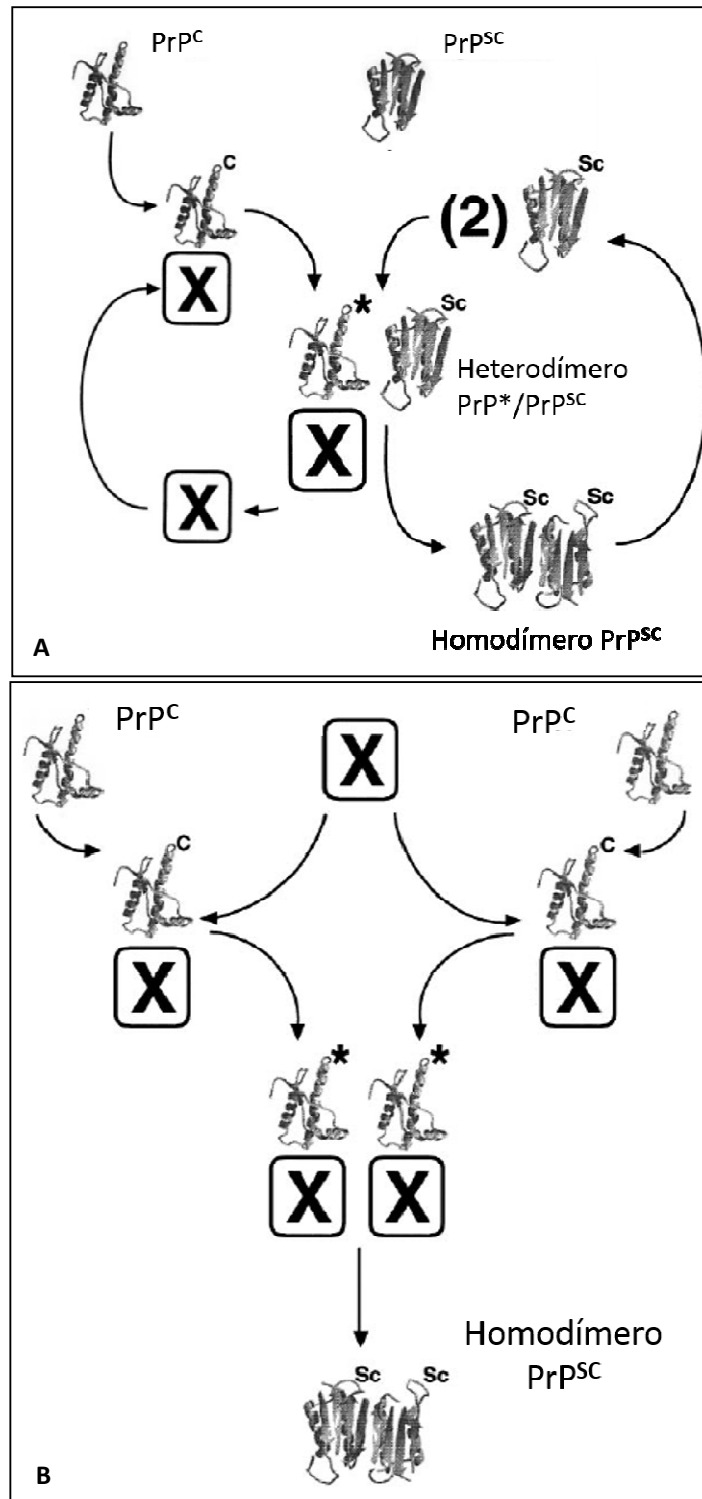
Los mecanismos moleculares que llevan a la transformación de la proteína priónica celular en su forma patológica no se conocen, sin embargo, de acuerdo a la teoría de “solo proteína” ocurriría un plegamiento anormal de la proteína que se propagaría de forma autocatalítica. Hoy en día se ha aceptado que la conversión de PrP^C en PrP^{SC} es un evento postraducciona que ocurre después que PrP^C ha alcanzado su localización en el dominio extracelular de las membranas neuronales y/o posteriormente, durante el transporte vesicular de PrP al interior de la neurona (Weissmann y col., 1999).

Varios modelos fueron propuestos para explicar el mecanismo de conversión de la PrP^C en PrP^{SC}, a continuación se comentan los dos más aceptados por la comunidad científica internacional (Eraña, 2015).

1.7.1. Modelo de conversión inducida por molde

Este modelo plantea la intervención de la proteína prion en tres conformaciones (PrP^C forma celular, PrP^{*}: forma conformacional alternativa o intermedia y PrP^{SC}: forma patológica) y una proteína accesoria denominada proteína X. Bajo este escenario se propone que la proteína X al unirse a la PrP^C catalizaría la transformación a PrP^{*}. Ambas formas se encontrarían fisiológicamente en el organismo en un estado de equilibrio. PrP^{*} sería la responsable de la formación de PrP^{SC} por dos vías, mediante la unión a una molécula de PrP^{SC} o por la unión a otra molécula PrP^{*}. De esta manera, cuando la enfermedad responde a la infección como casusa etiológica, PrP^{SC} se uniría a PrP^{*} generando un heterodímero. PrP^{SC} (actuando como molde) induciría la conversión de PrP^{*}, formando así un homodímero PrP^{SC}/PrP^{SC} que perpetuaría la propagación autocatalítica (ver figura 6 A). En las formas hereditarias, la presencia de alguna mutación aumentaría la concentración de PrP^{*} y/o la estabilidad del dímero PrP^{*}/PrP^{*}, aumentando la probabilidad de que uno de esos dímeros se convierta en homodímero PrP^{SC} desencadenándose el proceso autocatalítico. Finalmente, la formas esporádicas serían explicadas por este modelo por la ocurrencia de mutaciones somáticas que lleven a la producción PrP^{SC} o a eventos tan raros como la formación de dímeros PrP^{*}/PrP^{*} (Ver figura 6 B) (Cohen y Prusiner, 1998).

Figura 6. Modelo de conversión inducida por molde.



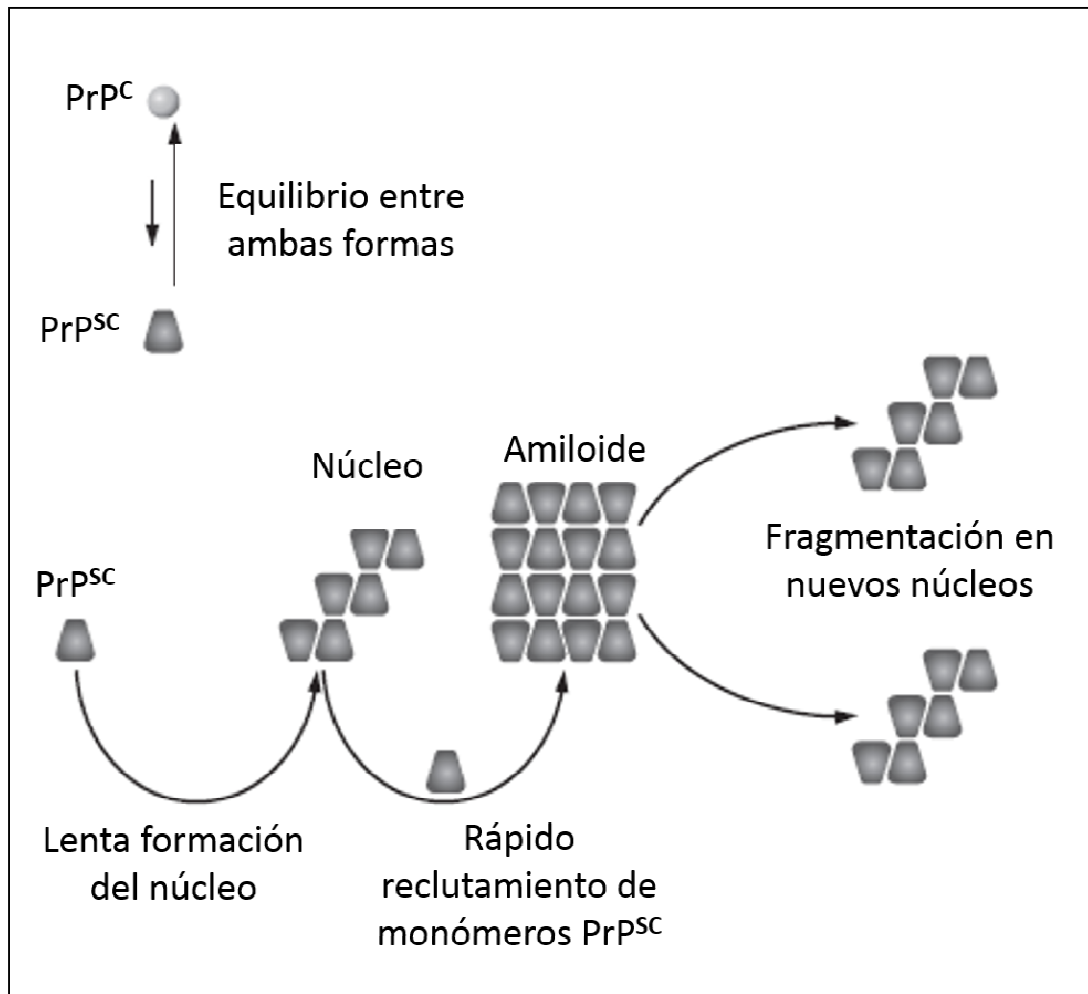
A) Síntesis endógena de PrP^{Sc} a partir de PrP^{Sc} exógena.

B) Síntesis endógena de PrP^{Sc} a partir de dímeros PrP^{*}. Modificado de Cohen y Prusiner (1998).

1.7.2. Modelo de nucleación polimerización.

Este modelo supone un equilibrio termodinámico reversible entre la PrP^C y la PrP^{SC} en solución (ver figura 7). Gracias a la inestabilidad monomérica de la PrP^{SC}, esta tiende a agregarse con otros monómeros PrP^{SC} y así alcanzar la estabilidad, formando núcleos o semillas. Luego de una fase de latencia y posterior crecimiento exponencial del núcleo al que se le van incorporando más moléculas PrP^{SC} se produciría la formación de agregados tipo amiloide. En esta situación, los núcleos inducirían de forma masiva la conversión de PrP^C a PrP^{SC}. Al alcanzar grandes dimensiones, cada núcleo podría fragmentarse y formar nuevas semillas que acelerarían el proceso autocatalítico (Caughey, 2001; Come y col., 1993).

Figura 7. Modelo de nucleación y polimerización.



*Modificado de Aguzzi y Calella (2009).

Ambos modelos presentan varias interrogantes y en consecuencia no puede optarse con total seguridad por uno de ellos, ya que la existencia y naturaleza de un factor de conversión (proteína X) y las formas intermedias (PrP*) no han podido demostrarse.

Los mecanismos de conversión de los priones celulares a priones infecciosos han sido un campo fértil de investigación en los últimos años. El descubrimiento de otras proteínas con características similares a los priones y asociadas a trastornos neurodegenerativos como la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson, el amiloide- β y tau implicados en el Alzheimer y muchas otras asociadas a la Esclerosis lateral amiotrófica han dado una nueva dimensión a la ciencia en el área de las prionopatías por su alta prevalencia nivel mundial (Fernandez-Borges y col., 2015)

1.8. La Encefalopatía Espongiforme Bovina

1.8.1. Una saga epidemiológica

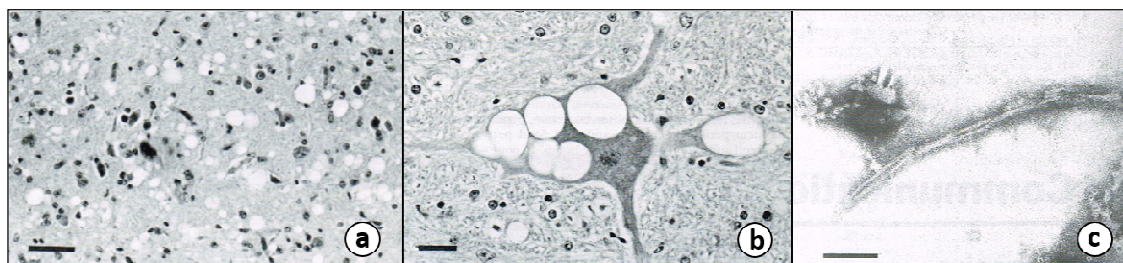
La década de los 80 fue de particular importancia para las prionopatías. No solo se logró identificar al controvertido agente causal de la enfermedad, además se describió la EET de mayor impacto epidemiológico, económico y social de la historia, la Encefalopatía Espongiforme Bovina.

El primer caso clínico reportado de EEB se dio en Reino Unido en abril de 1985 en una vaca adulta raza Holando perteneciente a una granja del sur de Inglaterra, en el condado de West Sussex (Wells y col., 1987). Para finales de ese año la cifra había alcanzado a 14 animales y en 1986 a otros 60 (Pattison, 1998). Clínicamente, los animales afectados se volvían aprensivos, hiperestésicos, y desarrollaban incoordinación en la marcha. Los individuos que normalmente eran dóciles y fáciles de manejar cambiaban su comportamiento, pateaban y reaccionaban de forma exagerada a estímulos visuales y auditivos. La incoordinación empeoraba con hipermetría, el comportamiento se tornaba peligroso, frenético e impredecible. Muchas veces los animales caían y la muerte sobrevinía en el decúbito si no eran sacrificados antes (Wells y col., 1987).

El estudio histopatológico realizado por Wells y col., (1987) en estos animales demostró cambios degenerativos bilaterales y simétricos a nivel de la materia gris del tallo cerebral, con vacuolas en el neuropilo y en el interior de las neuronas, acompañadas de una gliosis discreta (ver figura 8 a y b). El análisis por microscopía electrónica realizado por el mismo autor en homogeneizados de cerebro, reveló la presencia de fibrillas morfológicamente similares a aquellas asociadas al Scrapie (ver figura 8 c). Los hallazgos clínicos, histopatológicos y a la microscopía electrónica llevaron a los autores a establecer una semejanza con los casos de EETs reportados anteriormente, denominando a la enfermedad como Encefalopatía Espongiforme Bovina.

Los estudios epidemiológicos realizados a mediados de 1987, revelaron que la enfermedad podía haber sido causada por la exposición del ganado a un agente similar al del Scrapie durante el invierno de 1981-1982. La fuente más probable era el alimento, que contenía en su composición proteína derivada de ruminantes en la forma de harina de carne y hueso (Wilesmith y col., 1988).

Figura 8. Lesiones histopatológicas y varillas de prion en un caso de EEB.



a) numerosas vacuolizaciones en neuropilo de sustancia gris en un animal afectado. Núcleo solitario, médula oblonga. Hematoxilina-eosina, barra = 50 μ m; b) múltiples vacuolas en pericarion neuronal en un animal afectado. Formación reticular, médula oblonga. Hematoxilina-eosina, barra = 25 μ m; c) Micrografía electrónica de lisado de encéfalo fresco de un animal afectado. Se observan fibrillas similares a las reportadas al Scrapie. Tinción negativa, barra=100nm. Modificado de Wells y col. (1987)

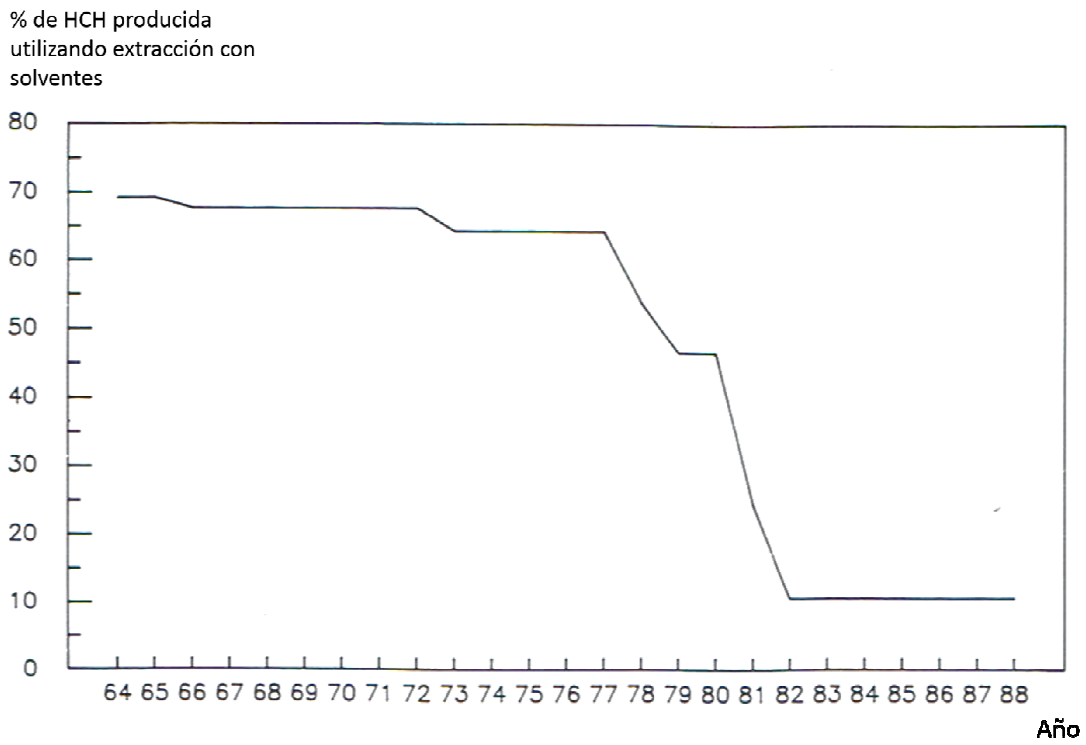
La harina de carne y hueso (HCH) es un subproducto elaborado a partir del “rendenring” o reciclado de la carcasa animal y material de desecho, principalmente de la industria frigorífica, que desde tiempos muy tempranos hasta la década de

1920 fue utilizado para la extracción de sebo. En el año 1988, Inglaterra contaba con 46 plantas activas de rendering que producían sebo y HCH. En conjunto, procesaron 1,3 millones de toneladas de materia prima solo en ese año. Si bien no todas las plantas mantenían un registro adecuado del tipo de materia prima procesada, se pudo estimar que el 15,9% provenía del trimming, 30,5% de los huesos, 33,4% de las menudencias, 8,9% de las carcasas y el 11,1% restante de otros tejidos. Al considerar la especie, el 44,8% de la materia prima era de origen bovino, el 20,9% porcino, el 15,3% ovino y el 19 % restante de otras especies incluidas las aves. La mayor parte de la materia prima provenía de los mataderos, salvo las carcasas enteras, estas provenían de animales que morían en las granjas (Wilesmith y col., 1991), momento en que la explotación ovina se encontraba en franca expansión y la ocurrencia del Scrapie era significativa (Taylor y col., 1995).

La utilización de solventes hidrocarbonados acoplados al proceso de cocción, permitía aumentar el rendimiento de extracción del sebo, sin embargo, era necesario aplicar una etapa de calor húmedo posterior para eliminar los restos de solventes. Este calor, pudo haber ejercido un efecto protector contra la enfermedad, dada la susceptibilidad del agente al calor húmedo (Wilesmith y col., 1991). Durante los años de máxima exposición de los bovinos al agente, ocurrieron cambios en el proceso tecnológico del rendering, los solventes comenzaron a caer en desuso y con ellos la etapa de calor posterior (Ver figura 9). Esto fue de marcada importancia desde un punto de vista epidemiológico, si se considera la interacción de dos factores: posible ingreso de ovinos con Scrapie a la industria del rendering y desuso de solventes en el proceso de extracción.

En base a estos hallazgos, en julio de 1988 se prohibió en Inglaterra la incorporación de HCH en la alimentación de rumiantes (Hoinville y col., 1994). El producto acumulado, no consumido dentro del país, se exportó a la Unión Europea (UE) y de ahí a otros países, diseminando el agente por varias partes del mundo. Para el año 1995, la enfermedad se había distribuido rápidamente por todo Reino Unido (ver figura 10), alcanzando un pico epidemiológico de 37.280 casos solo en 1992 (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/datos-especificos-de-eeb/numero-de-casos-en-el-reino-unido/> consultado 26/05/17).

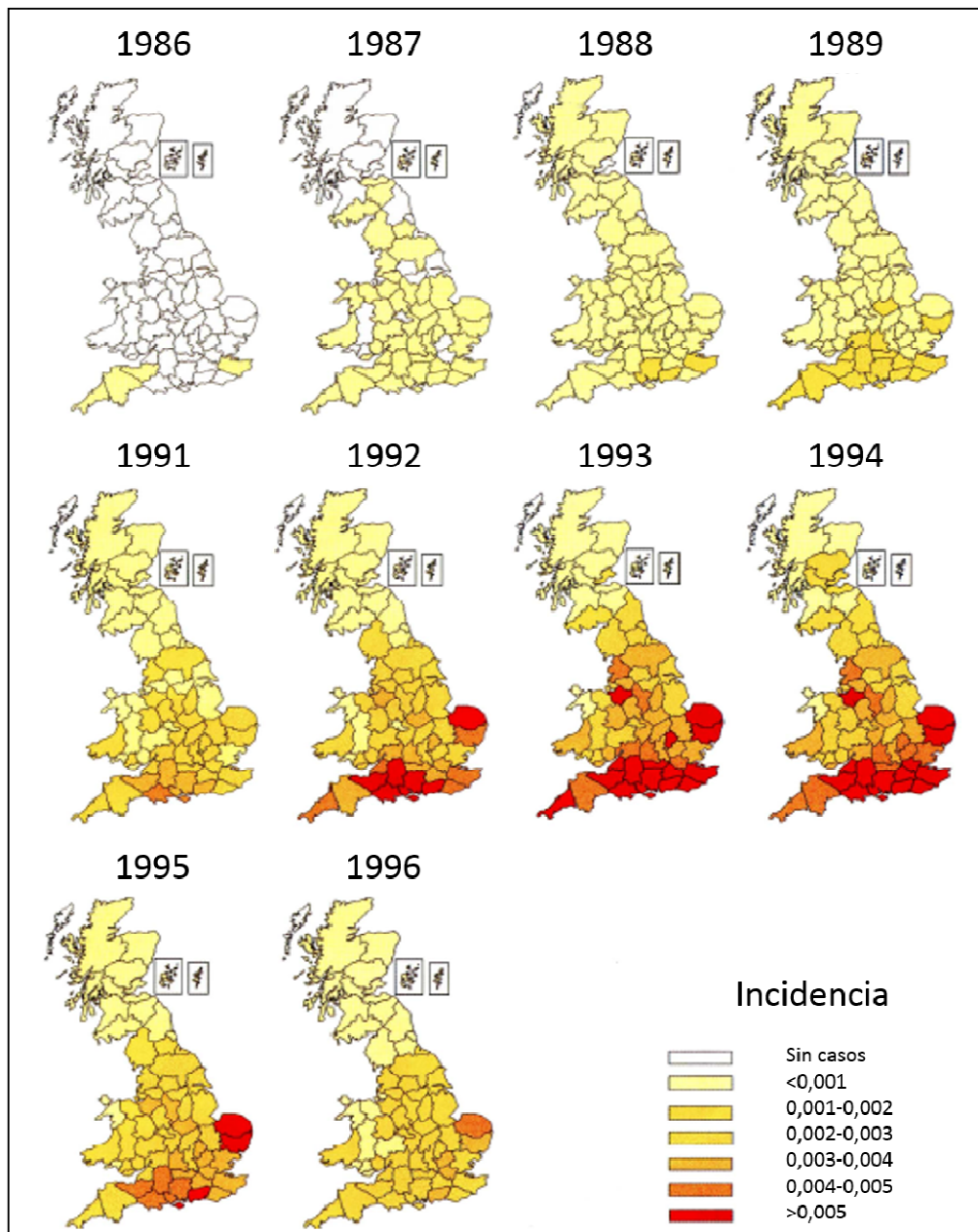
Figura 9. HCH producida EN Reino Unido (%) utilizando solventes hidrocarbonados entre 1964 y 1988.



*Modificado de Wilesmith y col. (1988).

Hacia el año 1997 se habían diagnosticado más de 170.000 casos clínicos de EEB, con al menos un animal enfermo por establecimiento en dos tercios de los rodeos lecheros del país. Cifras más impresionantes se obtuvieron mediante los modelos desarrollados para el análisis retrospectivo del SIDA, estimándose que para producir 170.000 casos clínicos de EEB, al menos un millón de animales debieron haber estado infectados (Pattison, 1998).

Figura 10. Distribución espacial de la incidencia de EEB en Reino Unido entre 1986 y 1995.

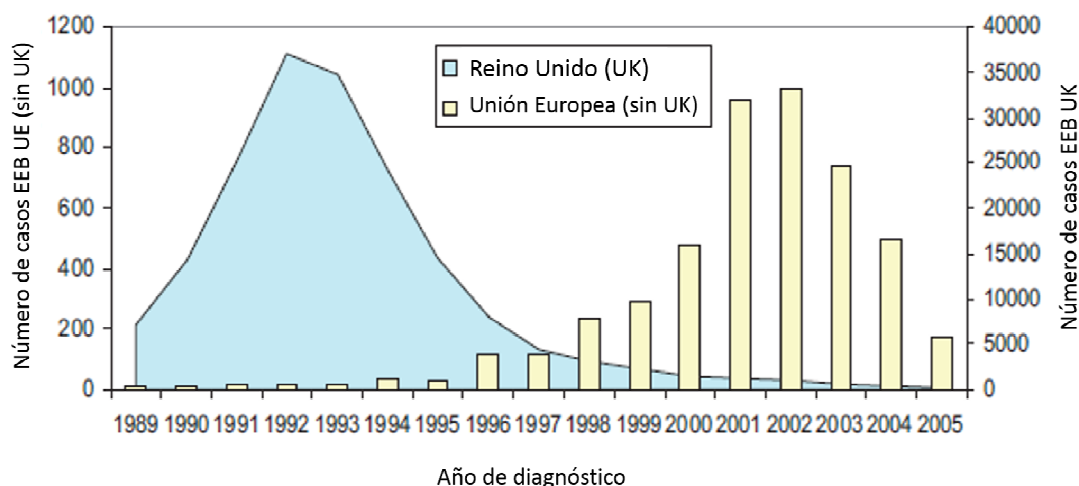


*Modificado de Anderson y col. (1996).

Si bien la medida de prohibir la alimentación de los bovinos con raciones elaboradas con HCH fue efectiva para disminuir los casos de la enfermedad, esto no era consistente con los 44.000 casos reportados en animales nacidos tras la prohibición. Un estudio detallado reveló que la posible fuente de transmisión, era los alimentos contaminados con raciones de cerdos y aves en los que la incorporación de HCH aún era permitida (Bradley y col., 2006).

En la medida en que los casos de EEB fueron disminuyendo en Reino Unido (UK), comenzaron a surgir en la UE (ver figura 11), posiblemente producto de la importación de HCH desde UK (hasta su prohibición en la UE para la alimentación animal en 1994) o a la importación de animales en pie del mismo origen (Ducrot y col., 2008).

Figura 11. Casos diagnosticados de EEB entre 1989 y 2005 en Inglaterra y UE.



*Modificado de Ducrot y col. (2008)

1.8.2. Las formas clásica y atípica de la EEB. El fenómeno de cepas y el cuestionamiento al origen de la EEB

Durante muchos años se creyó que la EEB se comportaba como una enfermedad uniforme causada por una sola cepa de prion. Sin embargo, entre los años 2003 y 2004, tres grupos de investigadores independientes documentaron la primera

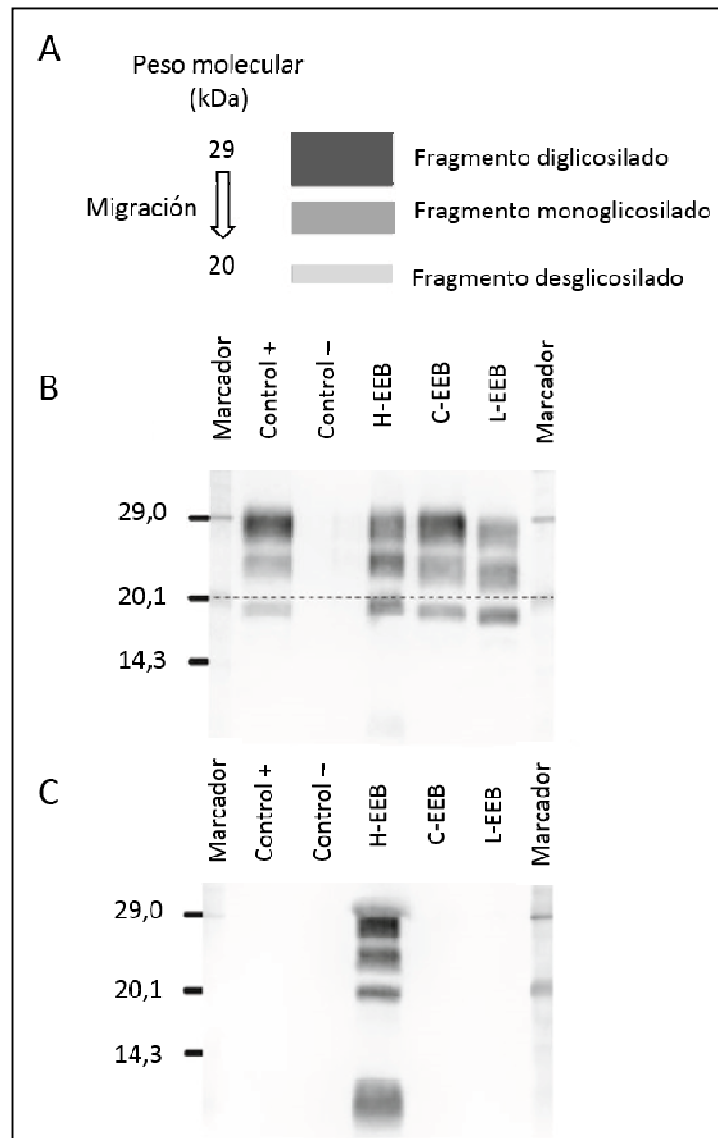
evidencia del fenómeno de cepas para la EEB. Yamakawa y col., (2003) describen la infección por EEB en un novillo Holando, aparentemente sano, de 23 meses de edad durante las pruebas de rutina realizadas en frigorífico. Si bien el agente causal parecía ser el mismo, sus características bioquímicas eran diferentes a las reportadas inicialmente por Wells y col., (1987). Posteriormente Casalone y col., (2004) describen dos infecciones en Italia y Bicabe y col., (2004) describen 3 más en Francia, con cepas bioquímicamente distintas entre sí y de la proteína priónica clásica. Desde ese entonces, la forma clínica descrita en 1986 fue denominada EEB clásica (C-EEB) y la infección con las nuevas cepas se denominó EEB atípica. Dos tipos de EEB atípica fueron descritos: H-EEB y L-EEB. Los prefijos H y L indican alto y bajo peso molecular de la proteína PrP^{Sc} respectivamente, en comparación con la EEB clásica, al realizar un western blot luego de una digestión parcial con proteinasa K. Otras diferencias son la proporción de glicosilación relativa de la PrP^{Sc} (forma L) y el reconocimiento con anticuerpos del extremo amino terminal (forma H) (ver figura 12). Una vez identificadas las diferencias, se lograron identificar 100 casos de EEB atípica en todo el mundo desde el año 2004 (Boujon y col., 2016).

La mayor parte de los casos de EEB atípica han sido diagnosticados durante los programas de vigilancia epidemiológica, por lo que muy poco se sabe de acerca del comportamiento clínico natural de las formas H y L. Sin embargo, estudios de infección experimental en bovinos han reportado signos como: marcha y posturas anómalas, ataxia, letargia, ansiedad, pérdida propioceptiva, pérdida ponderal, decúbito, mioclonias e incapacidad para reincorporarse, sin cambios comportamentales como agresividad o nerviosismo (Konold y col., 2014; Okada y col., 2011).

Si bien los signos son similares a los de la EEB clásica, existen diferencias clínicas, epidemiológicas y neuropatológicas claras. En primer lugar, las formas atípicas tienden a afectar animales de edad más avanzada (12 años en promedio) en comparación con la forma clásica de la enfermedad (5 años en promedio). Además, las formas atípicas han sido diagnosticadas en países en los que no se reportaron casos previos de EEB clásica. A diferencia de esta última, en que los casos han venido disminuyendo con el tiempo, los casos atípicos se han mantenido constantes (Bicabe y col., 2008). En base a esto, varios autores han planteado que las formas

H-EEB y L-EEB no guardan relación alguna en sus orígenes con la forma clásica de la enfermedad y, al igual que en la ECJ, podrían tratarse de formas esporádicas (Boujon y col., 2016).

Figura 12. Diferenciación de los tipos de EEB por Western Blot.



A, representación esquemática del patrón de migración de PrP^{Sc} luego del tratamiento con proteínasa K. **B**, Western Inmunobot (anticuerpo Sha31) mostrando las diferencias de peso molecular de los fragmentos en cada tipo de EEB. **C**, Anticuerpo N-terminal (12B2) unido exclusivamente a la forma H-EEB. Modificado de Boujon y col. (2016).

Una de las características más notables de las cepas priónicas, es su capacidad para afectar las regiones cerebrales de forma diferencial, evidenciando blancos neuronales específicos que serían los responsables de las diferentes manifestaciones clínicas y de los patrones de vacuolización en el cerebro. En este aspecto, las diferencias neuropatológicas entre las formas atípicas y clásica de la EEB son evidentes, con lesiones vacuolares localizadas en porciones más rostrales del encéfalo en la forma L y a nivel del tálamo en la forma H (Okada y col., 2008; Casalone y col., 2004). El fenómeno de tropismo celular que presenta cada cepa, probablemente esté relacionado con su estructura terciaria y cuaternaria que le permiten interactuar con diferentes moléculas (como receptores) y, a través de ellas, con diferentes poblaciones celulares (Aguzzi y col., 2008), aunque también podría estar relacionado con los diferentes patrones de glicosilación. Como el estado de glicosilación de PrP^C difiere en los distintos tipos celulares, el propio patrón de glicosilación de PrP^{Sc} la guiaría hacia las células diana, propagándose de forma más eficiente en aquellos tejidos que expresen un glicofoma similar de PrP^C (Collinge y col., 1996).

La identificación de cepas en la EEB ha replanteado las hipótesis acerca de su origen. Como se expuso anteriormente, Willesmith y col., (1988) vinculaba a la EEB con el Scrapie. Sin embargo, la transmisión del Scrapie a los bovinos solo ha podido lograrse de forma experimental mediante la inoculación intracerebral del agente y nunca por vía oral, resultando en un cuadro clínico muy diferenciado a las formas clásica y atípicas (H y L) de la EEB (Konold y col., 2013), lo que pone en duda esa hipótesis. Sumado a esto, se ha demostrado que las cepas atípicas se pueden transformar en una forma no diferenciable de la cepa clásica de EEB tras pasajes seriados en roedores (Beringue y col., 2007; Capobianco y col., 2007). Esto abrió las puertas a nuevo escenario, donde se plantea la hipótesis de que la C-EEB pudo tener su origen en las formas atípicas (esporádicas) de la enfermedad, y que se transformaron en la forma clásica conocida, tras sucesivos pasajes en bovinos u otros huéspedes intermediarios que sistemáticamente ingresaban al proceso de “rendering” (Boujon y col., 2016).

Independientemente de la forma clásica o atípica de la enfermedad es clara su importancia, dadas las pérdidas económicas provocadas y su impacto en la salud pública, al descubrirse nuevas EETs relacionadas a la EEB.

1.8.3. Encefalopatías espongiformes asociadas a la EEB

1.8.3.1. *La Encefalopatía Espongiforme Felina y la Encefalopatía Espongiforme de Ungulados Exóticos*

En 1990 se describió la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) en un gato doméstico de raza siamés y 5 años de edad (Aldhous, 1990), desde entonces alrededor de 100 casos han sido reportados en gatos domésticos hasta el 2011, principalmente de Inglaterra con apenas un solo caso en Irlanda, Noruega, Liechtenstein y Suiza. En felinos salvajes en cautiverio se reportaron 29 casos, incluidos 15 guepardos, 4 leones, 3 ocelotes, 3 pumas, 3 tigres y un gato asiático dorado. Los casos de EEF en felinos salvajes han sido reportados en zoológicos de Inglaterra, Francia, Australia, Irlanda y Alemania, sin embargo todos los animales tuvieron su origen o estuvieron cautivos en Inglaterra, salvo una hembra guepardo y su cachorro nacidos en Francia. Todos estos casos ocurrieron en paralelo a la epidemia de EEB, y si bien su origen no es claro, se estima que la exposición a alimentos contaminados puede haber sido responsable de la enfermedad (Imran y Mahmood, 2011). Sumado a esto, ratones inoculados con homogeneizados de cerebros de animales afectados de EEB y EEF mostraron el mismo patrón de lesiones neuropatológicas, así como un periodo de incubación similar, sin diferencias bioquímicas entre el prion infeccioso bovino y el felino (Eiden y col., 2010). Todo esto dio apoyo a la hipótesis de que la EEF tuvo su origen en la EEB, y que los animales se infectaron por dos vías: los felinos domésticos al consumir raciones elaboradas con HCH contaminada y los animales salvajes al consumir carne y órganos de alta carga priónica (SNC) de animales afectados (Pattison, 1998). La sintomatología clínica incluía cambios de comportamiento (más tímidos o agresivos que de costumbre), ataxia, hipermetría e hiperestesia a los estímulos táctiles o auditivos, salivación excesiva, polifagia, polidipsia, temores y convulsiones (Aguilar-Calvo y col., 2015; Sigurdson y Miller, 2003).

Simultáneamente al curso epidémico de la EEB, varios rumiantes exóticos de la familia *Bovidae* se vieron afectados por una rara enfermedad neurológica, que poco tiempo después se dio a conocer como encefalopatía espongiiforme de los ungulados exóticos (EUE). Todos los casos fueron reportados en zoológicos de Inglaterra, enfermando 6 antílopes kudú, 6 antílopes eland, 2 antílopes oryx de Arabia, 2 vacas ankole, 1 antílope niala, 1 antílope oryx de cuerno de cimitarra, 1 antílope orice del Cabo y 1 bisón. Al igual que para la EEF, la inoculación en ratones mostró el mismo periodo de incubación, las mismas lesiones neuropatológicas y no pudieron establecerse diferencias entre el prion de la EEB y el de la EUE. Los signos clínicos fueron variables de acuerdo a la especie y si bien el origen de la EUE no logró establecerse, se postuló que la enfermedad pudo tener su origen en la exposición de los animales a raciones elaboradas con HCH contaminadas con el prion infeccioso (Kirkwood y Cunningham, 1994). Tanto los casos de EEF como de EUE disminuyeron al eliminar de la alimentación las posibles fuentes del agente infeccioso.

1.8.3.2. La nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

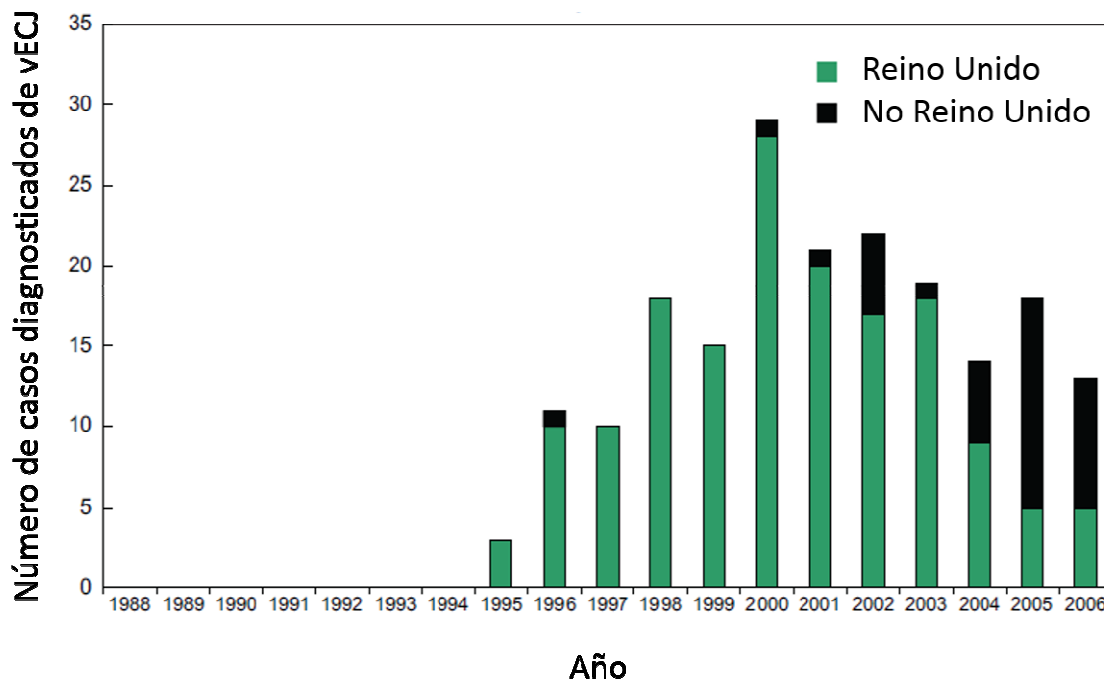
La verdadera repercusión social y económica de la EEB no llegaría hasta mayo de 1995, cuando se dio la primera muerte por ECJ en un adolescente británico. En octubre del mismo año se produjo la muerte de un segundo adolescente afectado, y para enero de 1996 ya eran tres más los casos de ECJ en jóvenes que no superaban los 29 años de edad. Para el 8 de marzo de 1996, el Comité Asesor de Encefalopatías Espongiiformes (CAEE) de Reino Unido dio a conocer ocho casos de lo que denominaron variante de la ECJ (nvECJ). Varias características lograban diferenciarla de la ECJ clásica, entre ellas: la temprana edad de los afectados (edad media de muerte 28 años vs 66 años), el largo periodo de la fase clínica de la enfermedad (14 meses vs 5 meses) y diferencias neuropatológicas. El 20 de marzo de 1996, el gobierno anunció la existencia de 10 casos confirmados de nvECJ, así como la opinión del CAEE acerca de su posible relación con la EEB (Budka y Will, 2015; Pattison, 1998). La evidencia más importante que apoyaba esa relación la aportaron Collinge y col., (1996) al comparar los patrones de digestión de la proteína priónica infecciosa con proteinasa K. Este trabajo mostró las diferencias entre el prion de la nvECJ y el de la ECJ clásica, así como su similitud con el prion de la EEB

y el de la EEF. Sumado a esto, los trabajos de Bruce y col., (1997) brindaron un apoyo contundente a la teoría, demostrando que el comportamiento del material infeccioso de la nvECJ, al inocularse en ratones, era idéntico al de la EEB y EEF en concepto de periodo de incubación y lesiones neuropatológicas.

La ruta de transmisión nunca pudo ser demostrada de forma definitiva, sin embargo, se presume que los alimentos contaminados con el prion de la EEB fue la vía más probable, a pesar de las estrictas prohibiciones implementadas para evitar que los tejidos bovinos con alta carga priónica ingresaran a la cadena de consumo (Pattison, 1998). Para el año 2006, la nvECJ alcanzaba proporciones pandémicas (ver figura 13) con 300 casos reportados en Reino Unido e Irlanda del Norte, 16 en Francia, tres en la República de Irlanda, dos en Estados Unidos y uno en Arabia Saudita, España, Italia, Japón, Países bajos, Canadá y Portugal. Todos países con casos previos de EEB a excepción de Arabia Saudita (Bradley y col., 2006). Los últimos dos casos reportados de nvECJ se dieron uno en Reino Unido y otro en Estados Unidos en 2012, sin reportes confirmados hasta el 2015 (Budka y Will, 2015).

Si bien los casos de C-EEB han venido disminuyendo en el mundo desde el pico epidémico de 1992, las formas atípicas, aunque con escasos reportes, se han mantenido constantes en el mundo (Bicabe y col., 2008). La pregunta acerca del potencial zoonótico de estas cepas aún no ha sido respondida, sin embargo la forma L (no así la H) ha podido ser transmitida en ratones transgénicos para el gen *PRNP* humano (Beringue y col., 2008), así como a primates tras inoculación intracerebral e incluso tras exposición oral al agente (Comoy y col., 2008; Ono y col., 2011). La preocupación social aún sigue frente a esta enfermedad, por lo que las medidas de control aplicadas en los diferentes países respecto a los órganos bovinos de riesgo continúan siendo fundamentales.

Figura 13. Incidencia de la nvECJ en Reino Unido y otros países (Irlanda, Francia, Estados Unidos, Arabia Saudita, España, Italia, Japón, Países bajos, Canadá y Portugal) entre 1988 y octubre de 2006.



*Modificado de Aguzzi y col. (2008).

1.9. Impacto económico y social de la EEB

La EEB es la EET de mayor impacto económico y social en el mundo, dado su potencial zoonótico y la naturaleza inevitablemente mortal de la enfermedad en el hombre. Durante los años comprendidos entre 1986 y 1996, un estimado de 750.000 animales infectados por EEB fueron sacrificados para el consumo humano en Gran Bretaña (Anderson y col., 1996). Estas cifras, interpretadas en el marco de la suposición del Comité Científico Directivo de la Unión Europea de que hasta 500.000 personas pudieron estar expuestas al agente a partir de un solo bovino infectado, alimentó la especulación de que millones de consumidores estuvieron en una situación de riesgo (Ghani y col., 2000). Todo esto puso en alarma a la opinión pública, afectando el consumo de carne bovina y los mercados internacionales, siendo la EEB aún hoy en día la principal barrera sanitaria para el comercio en el sector ganadero.

En el mercado interno, el impacto económico se reflejó de diferentes maneras de acuerdo al país y se vio directamente relacionado a la percepción de riesgo por parte del consumidor. En Reino Unido, el efecto económico de la crisis de EEB fue inmediato. La disminución del consumo de carne vacuna, provocó una caída de 21% en su precio, con un aumento concomitante del costo de 19% y 21% para la carne de cordero y cerdo respectivamente. La dinámica de precios mostraba el efecto de la oferta y demanda de productos, reflejando claramente la preferencia de los consumidores en cuanto al origen de la proteína animal de su dieta. El precio del cordero y del cerdo se mantuvo elevado hasta el año 2000, cuando volvió a los niveles precrisis. En cambio, el precio de la carne bovina se mantuvo bajo desde el inicio de la crisis, probablemente reflejando un cambio duradero de la preferencia de los consumidores (Leeming y Turner, 2004). En la UE, la crisis de Reino Unido produjo una reducción del 6% en el consumo de carne bovina, recuperando los niveles normales en un periodo de 4 años (Morgan, 2000).

En respuesta a los brotes de EEB, varios países fuera de la UE cerraron sus mercados a la carne bovina de ese origen. En este contexto, Japón cesó la compra de carne, productos elaborados con carne y semen de toros de origen europeo, realizando el 66% de las importaciones de productos bovinos en el periodo 1998-2001 desde Estados Unidos y Australia. A pesar de ello, Japón fue el primer país fuera de la UE en reportar un caso de EEB, con repercusiones internacionales directas como el cierre inmediato del mercado en China, Korea del Sur, Singapur, Malasia y Filipinas. Así mismo, sufrió pérdidas en el precio y en los niveles de consumo en el mercado interno, estimándose que el 60% de los consumidores japoneses han dejado de consumir carne desde el primer caso de EEB (Jin y col., 2004). Situaciones similares han sido reportadas en todos los países en los que se ha diagnosticado EEB. Un ejemplo de esto lo constituye Estados Unidos, donde un solo caso de EEB en el estado de Washington en 2003 representó una reducción de las exportaciones de carne bovina en 2004, con pérdidas valuadas aproximadamente en 3.5 billones de dólares (Murdoch y Murdoch, 2015). En base al impacto económico de la EEB es claro que los países con bajo riesgo a padecer la enfermedad, dados los controles oficiales, tienen una imagen privilegiada frente a los mercados internacionales.

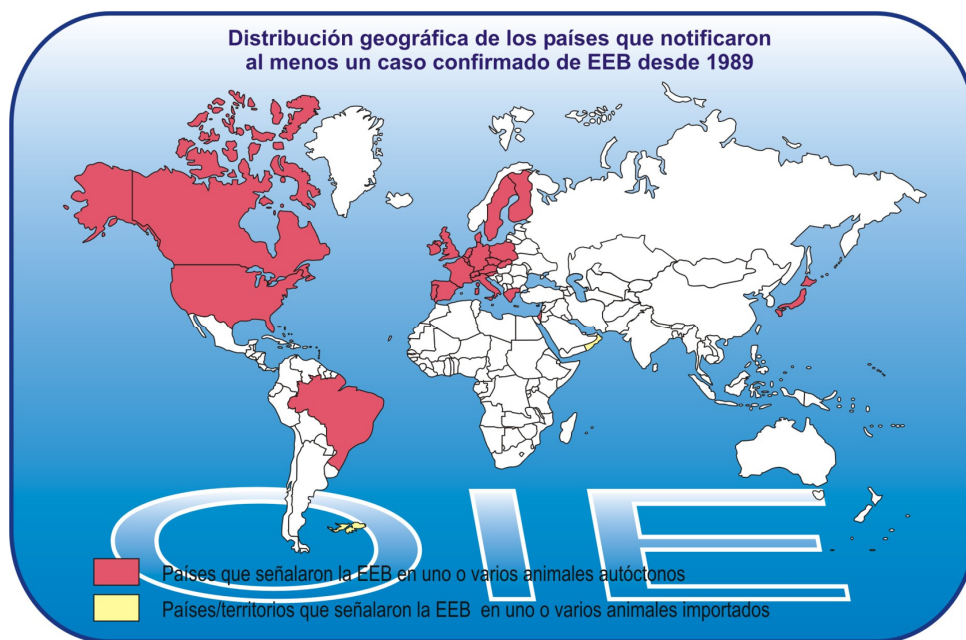
En el año 2003 se detectó el primer caso de transmisión secundaria (iatrogénica) de la nvECJ por transfusión de sangre. En los años siguientes, el grupo de infectados por vía secundaria había alcanzado la cifra de 66 personas, de las cuales solo 28 lograron sobrevivir 5 años. El descubrimiento de la vía transfusional como ruta de infección altamente eficiente y, a pesar de que no se han reportado casos, la posibilidad de infección en procedimientos quirúrgicos, reavivó la voz de alarma social en torno a la EEB (Bishop y col., 2008).

1.10. Situación Actual de la EEB en el mundo

La OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) es una figura del derecho internacional, encargada de elaborar normas, directrices y recomendaciones que son tomadas a modo de referencia por varios países en el mundo. Gracias a sus expertos y red mundial de laboratorios de referencia y centros colaboradores, la OIE ha facilitado asesorías, asistencia técnica y diseños de estrategias orientadas al control y erradicación de la EEB. Si bien la enfermedad se encuentra relativamente dispersa por el mundo (ver figura 14), la OIE lleva registros cuidadosos de los países que presentan o presentaron casos de la enfermedad, así como la naturaleza de los mismos, ya sean casos clásicos o atípicos, autóctonos o importados (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-sobre-eeb/> consultado 25/05/17).

Gracias a las directrices establecidas por la OIE, varios países han desarrollado programas de vigilancia epidemiológica, con el objetivo de identificar posibles casos de la enfermedad. Los programas sanitarios desarrollados por Uruguay, son un ejemplo de esto, a pesar de no tener casos reportados de ninguna EET en la historia. Esta información ha posibilitado a la OIE clasificar a los países o zonas de países según el riesgo a padecer la enfermedad de acuerdo a las disposiciones del capítulo 11.4 del código terrestre (ver tabla 1).

Figura 14. Distribución de la EEB en el mundo. Casos confirmados desde 1989.



Fuente: OIE 2017 (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/datos-especificos-de-eeb/mapa/>, consultado 25/05/17).

La mayor parte de los países de Europa han sufrido la enfermedad (20 países de 28). Reino Unido reportó casos de forma ininterrumpida desde el primer diagnóstico en 1986 hasta el 2015 donde solo se diagnosticaron un caso de C-EEB y otro de H-EEB. Históricamente Gran Bretaña ha sido la nación más afectada, seguida de Irlanda del Norte y Guernsey. Desde el 2016 a la fecha no se han reportado nuevos casos (ver Tabla 2).

Según datos de la OIE (2017) las comunicaciones de EEB clásica y atípica fuera de Reino Unido, desde 1989 hasta el 30 de junio de 2016, sumaban un total de 6044 casos. El pico epidemiológico fuera del país de origen de la enfermedad se alcanzó en 2002 con 1035 diagnósticos. Dentro de la UE, históricamente el país más afectado por la enfermedad fue Irlanda con 1656 casos reportados, seguida por Portugal (1083 casos) y Francia (1027). En los últimos 15 años Irlanda continúa siendo el país europeo con más casos acumulados (819) seguida ahora por España (705), Francia (511) y Portugal (444), si bien todos los países han logrado reducir significativamente los casos desde el pico epidémico de 2002.

En los últimos dos años se comunicaron 4 casos de C-EEB (Canadá, España, Francia e Irlanda) y tres casos atípicos de la enfermedad, dos H-EEB (Eslovenia y Noruega) y un L-EEB (España) (Ver tabla 3).

Tabla 1. Países o zonas de países miembros de la OIE con riesgo insignificante o controlado para la EEB según disposiciones del capítulo 11.4 del código terrestre.

Riesgo de EEB insignificante		
Alemania	Eslovenia	México
Argentina	España	Namibia
Australia	Estados Unidos de América	Noruega
Austria	Estonia	Nueva Zelanda
Bélgica	Finlandia	Países Bajos
Brasil	Hungría	Panamá
Bulgaria	India	Paraguay
Checa (Rep.)	Islandia	Perú
Chile	Israel	Portugal
Chipre	Italia	Rumania
Colombia	Japón	Singapur
Corea (Rep. de)	Letonia	Suecia
Costa Rica	Liechtenstein	Suiza
Croacia	Lituania	Uruguay
Dinamarca	Luxemburgo	
Eslovaquia	Malta	
Riesgo controlado		
Canadá	Irlanda	Reino Unido
Francia	Nicaragua	Taipei Chino
Grecia	Polonia	
Zona con riesgo de EEB insignificante		
China (Rep. Pop. de): sin Hong Kong y Makao		

Fuente: OIE 2017. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/eeb/estatus-sanitario-oficial/> consultado 26/05/17)

Tabla 2. Número de casos de EEB comunicados por Reino Unido, desde su aparición a la última actualización disponible en la OIE.

Año/Nación	Alderney	Gran Bretaña	Guernsey	Irlanda del Norte	Isla de Man	Jersey	Total
1987 y antes	0	442	4	0	0	0	446
1988	0	2.469	34	4	6	1	2514
1989	0	7.137	52	29	6	4	7228
1990	0	14.181	83	113	22	8	14407
1991	0	25.032	75	170	67	15	25359
1992	0	36.682	92	374	109	23	37280
1993	0	34.370	115	459	111	35	35090
1994	2	23.945	69	345	55	22	24438
1995	0	14.302	44	173	33	10	14562
1996	0	8.016	36	74	11	12	8149
1997	0	4.312	44	23	9	5	4393
1998	0	3.179	25	18	5	8	3235
1999	0	2.274	11	7	3	6	2301
2000	0	1.355	13	75	0	0	1443
2001	0	1.113	2	87	0	0	1202
2002	0	1.044	1	98	0	1	1.144
2003	0	549	0	62	0	0	611
2004	0	309	0	34	0	0	343
2005	0	203	0	22	0	0	225
2006	0	104	0	10	0	0	114
2007	0	53	0	14	0	0	67
2008	0	33	0	4	0	0	37
2009	0	9	0	3	0	0	12
2010	0	11	0	0	0	0	11
2011	0	5	0	2	0	0	7
2012	0	2	0	1	0	0	3
2013	0	3	0	0	0	0	3
2014	0	1	0	0	0	0	1
2015	0	2	0	0	0	0	2
2016	0	0	0	0	0	0	0
Total	2	181.137	700	2.201	437	150	184.627

Modificado de OIE 2017 (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/datos-especificos-de-eeb/número-de-casos-en-el-reino-unido/> consultado 26/05/17).

Tabla 3. Número de casos de EEB comunicados fuera de Reino Unido, desde 1989 hasta el 30/06/16.

País /Año	hasta 2001	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	Total
Alemania	138	106	54	65	32	16	4	2	2	0	0	0	0	1 ^b ,1 ^d	0	0	421
Austria	1	0	0	0	2	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	8
Bélgica	65	38	15	11	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	123
Brasil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^d	0	1 ^d	0	0	2
Canadá	1	0	2	1	1	5	3	4	1	1	1	0	0	0	1	0	20
Checa (Rep. ~)	2	2	4	7	8	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	30
Dinamarca	8	3	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	15
Eslovaquia	5	6	2	7	3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	25
Eslovenia	1	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1 ^d	0	9
España	84	127	167	137	98	68	36	25	18	13	6	6 ^c	0	1,1 ^b	1 ^b	1	789
US	0	0	0	0	1 ^a	1 ^a	0	0	0	0	0	1 ^a	0	0	0	0	3
Finlandia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Francia	516	239	137	54	31	8	9	8	10	5	3	1	2 ^d	2 ^b , 1 ^d	0	1	1027
Grecia	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SD	1
Irlanda	837	333	183	126	69	41	25	23	9	2	3	3	1	0	1	0	1214
Israel	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Italia	50	38	29	7	8	7	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	142
Japón	3	2	4	5	7	10	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	36
Liechtenstein	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Luxemburgo	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SD	2
Noruega	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^d	0	1
Países Bajos	28	24	19	6	3	2	2	1	0	2	1 ^b	0	0	0	0	0	88
Polonia	0	4	5	11	19	10	9	5	4	2	1 ^b	3	1	0	0	0	74
Portugal	639	86	133	92	46	33	14	18	8	6	5	2	0	1	0	0	703
Rumania	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1, 1 ^b	0	0	2
Suecia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SD	1
Suiza	408	24	21	3	3	5	0	0	0	0	2 ^b	1 ^d	0	0	0	0	467
Total	2791	1035	778	535	336	215	112	88	58	34	22	18	4	11	5	2	6044

^a EEB atípica, ^b L-EEB, ^c 3 casos de EEB atípica en España, ^d H-EEB, SD= sin datos. Modificado de OIE 2017 (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/datos-especificos-de-eeb/numero-de-casos-en-el-mundo-con-excepcion-del-reino-unido/>).

En el continente sudamericano, Brasil es el único país afectado, con dos casos de reciente documentación, uno en el año 2012 y otro en el 2014, ambos correspondientes a la forma H-EEB. A pesar de esto el país sigue siendo catalogado como de riesgo insignificante a padecer la enfermedad, en primer lugar por tratarse de casos esporádicos de EEB y en segundo lugar por las medidas que Brasil viene tomando en materia de EEB desde el año 1990 con el objetivo de prevenir y ahora controlar la enfermedad (Ministerio de ganadería, Pecuaria y Abastecimiento, Brasil, 2017).

1.11. El gen *PRNP* Bovino. Estructura, regulación, variación y modulación de la enfermedad.

1.11.1. Estructura y regulación del gen *PRNP* bovino

El gen *PRNP* bovino se encuentra localizado en el cromosoma BTA13q17 (Ianuzzi y col., 1998), específicamente en la cadena forward. Tiene una longitud aproximada de 20 Kb, extendiéndose entre las bases 47.400.413 y 47.418.507 (ENSEMBL, 2017). Se organiza en tres exones y dos intrones. Los exones uno y dos son pequeños (53 pb y 98 pb respectivamente) comparados con el tercer exón de mayor tamaño (4091 pb). Los dos primeros exones se encuentran separados por el intrón 1 de 2436 pb, mientras que el intrón dos está formado por 13551pb (Choi y col., 2006). El número de exones e intrones no es igual en todas las especies (por ejemplo: dos exones y un intrón en el humano y el hámster), sin embargo, lo que sí es consistente entre todos los ortólogos es que el último exón es el que codifica la proteína completa (Murdoch y Murdoch, 2015). El gen *PRNP* bovino se transcribe en un ARNm de 4240 pb que posteriormente se traduce en la proteína PrP^C de 264aa (ENSEMBL, 2017). Se trata de un gen altamente conservado entre las especies, con un 83% de identidad nucleotídica y un 86% de identidad aminoacídica entre el bovino y el humano (Choi y col., 2006).

La región promotora del gen *PRNP* se encuentra localizada corriente arriba del primer exón (Sander y col, 2004) y como muchos genes *housekeeping* se caracteriza por no presentar cajas TATA. Esta peculiaridad se ha mantenido en todos los genes *PRNP* identificados hasta el momento (Baybutt y Manson, 1997). Dentro de la región promotora se encuentran sitios de unión para la proteína

represora RP58 que actuaría modulando la expresión del gen (Sander y col, 2005). Algunos trabajos han demostrado que el exón 1 tiene funciones importantes en lo que respecta a los procesos de represión de la expresión de *PRNP*, al aportar otros elementos inhibitorios (Haigh y col, 2007).

A falta de regiones TATA, *PRNP* presenta regiones ricas en GC principalmente localizadas dentro del intrón 1 y constituyen potenciales sitios de unión del factor de transcripción SP-1 (proteína específica 1) (Baybutt y Manson, 1997). Interesantemente, la enzima histona desacetilasa (HDAC) posee sitios de direccionamiento específicos para SP-1, por lo que la regulación de la expresión del gen *PRNP* podría estar mediada por dicha enzima (Doetzlhofer y col, 1999), en tal situación la presencia de SP-1 jugaría un rol fundamental.

La importancia del intrón 1 en los mecanismos de regulación, como parte importante del promotor o como una región promotora accesoria ya ha sido propuesta (Haigh y col, 2007), sin embargo, el hecho más importante es su capacidad de dar asiento a la acción reguladora de la región promotora del gen. Bajo este modelo, la proteína RP58 unida al promotor reprimiría la expresión de *PRNP* a través de una interacción con SP-1 (unida al intrón 1) (Hasse y col, 2007). Por este motivo, la integridad estructural del promotor y del intrón 1 resultan claves en los procesos de regulación de *PRNP*.

1.11.2. Variación del gen *PRNP* bovino y modulación de la enfermedad.

En vista de la inusual naturaleza del agente etiológico de la EEB, una proteína infecciosa codificada por un gen del propio huésped, varias investigaciones se han centrado en el rol que el mismo juega en la enfermedad. En este aspecto, varios grupos científicos se han enfocado en la caracterización molecular de *PRNP* en busca de marcadores de resistencia o susceptibilidad, que puedan ser factibles de incorporar en los programas de prevención y control de la EEB. La presencia de factores endógenos determinantes de la susceptibilidad individual a las EETs, es bien conocida (Bueler, 1993). Polimorfismos no sinónimos del gen *PRNP*, han demostrado influenciar la resistencia o la susceptibilidad a las enfermedades priónicas en humanos y en ovinos (Goldmann, 2008). En este aspecto, el gen *PRNP* bovino, ha sido previamente postulado como un locus candidato (Juling, 2006).

El gen *PRNP* bovino ha demostrado ser altamente polimórfico, con un total de 1379 variaciones de las cuales 64 corresponden a inserciones, 62 a deleciones, 1249 a SNPs y 4 repeticiones en tándem. Dentro de las regiones exónicas, solo se han identificado 101 polimorfismos de los cuales el 97% corresponden al tipo SNP y el 3% restante a deleciones (ENSEMBL, 2017). Ningún polimorfismo en la región codificante del gen pudo ser asociado con susceptibilidad a la enfermedad, a excepción de la mutación E211K. Esta mutación se encuentra localizada en el codón 211 del gen bovino, homólogo al codón 200 de los humanos que aloja la mutación E200K responsable de los casos de ECJ familiar. Descrita inicialmente en 1989, E200K surgió al menos en cuatro oportunidades en casos no relacionados (Goldgaber y col., 1989; Lee y col., 1999), provocando el cambio del codón GAG (E= glutamina) por el codón AAG (K= lisina). El alelo K tiene un efecto dominante, llevando al desarrollo de la enfermedad a edades avanzadas, aunque no todos los pacientes enferman (Cohen y col., 2016). En el caso de los bovinos, la transición G→A transforma al codón GAA (E= glutamina) en AAA (K= lisina). Las formas familiares representan más del 10% de las enfermedades priónicas en humanos (Kim y Jeong, 2017), sin embargo la prevalencia de la mutación E211K es muy baja (1/2000 animales, Richt y Hall, 2008) y no se ha encontrado nuevamente en otras poblaciones bovinas (Richt y Hall, 2008; Heaton y col., 2008; Gurgul y col., 2012; Sanches, 2014; Kim y Jeong, 2017).

En la última década, dos mutaciones del tipo inserción/delección -Indel- en la región no codificante del gen (23pb en el promotor y de 12pb en el intrón 1), han demostrado estar asociados con la susceptibilidad a la C-EEB, siendo las dos deleciones más frecuentes en los animales afectados (Sander y col., 2004). Innumerables trabajos han respaldado esas observaciones a excepción de Nakamitsu y col., (2006), pero lo atribuyen a la debilidad metodológica de solo incluir en el estudio a seis animales infectados. De todas formas, la susceptibilidad a la enfermedad es un fenotipo difícil de medir, y eso dificulta los posibles trabajos de asociación genotipo fenotipo. Los animales enfermos son claramente susceptibles, sin embargo, los animales sanos incluidos en los estudios de control enfermedad podrían llegar a desarrollarla años más tarde.

Análisis “*in silico*” del gen, demuestran que los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb se encuentran en sitios específicos de unión para factores reguladores de la transcripción, afectando la expresión de PrP^c (Sander y col., 2005). Estudios de funcionalidad del promotor, han comprobado que el alelo de inserción de 23pb, representa un sitio activo de unión para el represor RP-58. Este ejerce su efecto, gracias a la interacción con la proteína SP1 (Lee y col., 2002). SP1 tiene un sitio funcional de unión localizado en el alelo de inserción de 12pb (Hasse y col., 2007) de forma que cuando ambos alelos de inserción están presentes (haplotipo in23/in12) RP-58 se une al promotor ejerciendo su efecto represor a través de SP1. Cualquier otro haplotipo que contenga una o ambas deleciones inducirá fallas en la regulación del gen, puesto que la unión de ambos factores de transcripción es esencial para ello.

La imposibilidad de reprimir la actividad de *PRNP* llevará a mayores niveles de expresión de PrP^c (Sander y col., 2005). La hipótesis de que diferencias en los niveles de expresión de PrP^c puedan modular la susceptibilidad a las EETs o su tiempo de incubación ha sido claramente establecida (Bossers, 1996). Estudios realizados en ratones transgénicos, portadores de una sola copia funcional del gen *PRNP*, mostraron niveles menores de expresión de PrP^c. Cuando estos animales eran desafiados con partículas priónicas infecciosas, presentaban un incremento en el tiempo de incubación en relación a los animales normales, siendo los animales Knockout totalmente resistentes (Vilotte y col., 2001). Estas observaciones, probablemente puedan deberse a que la probabilidad de encuentro de PrP^{Sc} con PrP^c sea mayor en animales con altos niveles de expresión de PrP^c, acelerando el desarrollo del proceso patológico. Por este motivo, es esperable que los bovinos con mayores niveles de expresión de PrP^c, independientemente de la razón, tengan un periodo de incubación de la enfermedad más corto, o en su defecto mayor susceptibilidad, luego de la exposición ambiental al agente.

Existe un fundamento biológico por el cual ambos polimorfismos de deleción estarían asociados con la susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, la cercanía entre ambos (~ 2-Kpb) produce desequilibrio de ligamiento entre ellos (Brunelle y col., 2008), por lo que debe considerarse más el efecto del haplotipo que el de un alelo en concreto. Otras combinaciones haplotípicas dentro de *PRNP* han sido

asociadas con los casos clásicos de la enfermedad (Murdoch y col., 2010), así como otras regiones cromosómicas (Murdoch y col., 2011), pero no han sido confirmadas por trabajos posteriores.

Las frecuencias alélicas para las Indel de 23pb y 12pb han sido descriptas en pocas poblaciones. La mayoría de los datos disponibles son para la raza Holando, (Holstein-Friesian) conociéndose muy poco de la distribución del gen en otras razas. En Uruguay se han realizado algunos trabajos acerca de la distribución poblacional del gen *PRNP* en la raza Holando y Bovino Criollo de Uruguay. Los resultados fueron disímiles entre ambas poblaciones, indicando mayor resistencia genética a la EEB en Bovinos Criollos Uruguayos (Artigas y col., 2011).

Poco se conoce acerca de la estructura poblacional del gen *PRNP* en ganado de carne. Particularmente en la raza Aberdeen Angus, según el relevamiento bibliográfico realizado, solo se ha descrito la estructura poblacional de *PRNP* en Brasil (Kerber y col., 2008; Sanches y col., 2016) y Japón (Zhu y col., 2011). Por esto, nuevos estudios deben ser realizados en esa y otras razas carniceras a los efectos de conocer la situación de riesgo genético en las diferentes poblaciones bovinas del mundo.

2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Uruguay es un país tradicionalmente ganadero. Con más de 12 millones de bovinos, es uno de los principales exportadores de carne del mundo, con acceso a los mercados más exigentes. En el año 2016 se exportaron casi 300.000 toneladas de carne vacuna por cifras superiores a los 1400 millones de dólares (INAC, 2016). Dada la fuerte dependencia económica del país con el sector ganadero y la importancia económica de la EEB sobre los mercados internacionales, es importante conocer la dinámica poblacional de los dos principales marcadores moleculares relacionados con la resistencia a la enfermedad en la raza Aberdeen Angus, una de las principales razas cárnicas del país.

3. HIPÓTESIS

Los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb presentan polimorfismo en la población Aberdeen Angus de Uruguay con una dinámica poblacional similar a la presentada en la raza en otros países.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar la dinámica poblacional de los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb del gen *PRNP* en una muestra de bovinos Aberdeen Angus del Uruguay.

Objetivos Particulares

- Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb del gen *PRNP* en una muestra de bovinos Aberdeen Angus de Uruguay.
- Determinar si la población se encuentra en equilibrio génico de Hardy-Weinberg para los marcadores moleculares de ADN considerados.
- Determinar si los marcadores genéticos se encuentran en desequilibrio de ligamiento.
- Comparar los resultados obtenidos con los descritos en otras poblaciones Aberdeen Angus y otras razas *Bos taurus* a nivel internacional.
- Comparar los resultados obtenidos con los descritos en otras razas *Bos taurus* a nivel nacional.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material animal:

Se trabajó con 648 animales de la raza Aberdeen Angus, de ambos sexos, pertenecientes al banco de ADN del Área Genética. Los animales pertenecían a diferentes establecimientos de diferentes partes del país (Paysandú, Artigas, Flores y Florida) y a diferentes líneas genéticas. Las muestras utilizadas fueron evaluadas mediante espectrofotómetro de última generación Nanodrop ND1000 (Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal- Facultad de Veterinaria). Las muestras presentaron una pureza de 1,6-1,8 OD (relación de absorbancia 260nm/280nm) y fueron estandarizadas a una concentración mínima de ADN de 20ng/μL.

5.2. Análisis molecular:

Cada muestra fue analizada para los dos polimorfismos (indel 23pb e indel 12pb) contratando los servicios de la empresa GeneSeek de Estados Unidos (www.geneseek.com). La empresa utiliza el enfoque “custom assay genotyping” mediante métodos masivos de genotipado, basados en espectrometría de masa.

5.3. Análisis genético-poblacional:

En base a los genotipos obtenidos, se realizó un análisis genético poblacional utilizando el software de libre acceso en internet GENEPOP V4 ® (<http://kimura.univ-montp2.fr/%7Erousset/Genepop.htm>). Solo se consideraron aquellos animales que pudieron genotiparse para ambos polimorfismos. Se calcularon: frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas e índices de diversidad genética como heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) e índice de fijación de Wright F_{IS} para detectar posibles efectos de la selección o la endogamia..

La H_o hace referencia a la proporción observada de heterocigotas en la población, y fue calculada según la siguiente fórmula:

$H_o = \text{número de heterocigotas} / \text{número total de animales.}$

La H_e refiere a la proporción esperada de heterociotas en la población, y fue calculada según la siguiente fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

, donde i y k es el número de alelos.

El índice de fijación de Wright F_{IS} fue calculado utilizando la fórmula:

$$F_{IS} = 1 - \left[\frac{H_o}{H_e} \right]$$

, donde H_o y H_e son la heterocigosidad observada y esperada respectivamente.

El equilibrio génico de Hardy-Weinberg (H-W) para los polimorfismos considerados fue evaluado utilizando el test exacto de Fisher, empelando como hipótesis nula la existencia de equilibrio H-W.

La frecuencia de los haplotipos y diplotipos fue calculada por conteo directo.

El desequilibrio de ligamiento entre ambos marcadores (D y D') se analizó según Lewontin (1988), utilizando las siguientes fórmulas:

$$D = (G_{11})(G_{22}) - (G_{12})(G_{21})$$

$$D' = \frac{D}{D_{max}}$$

donde G_{11} y G_{22} corresponden a haplotipos en fase de acomplamiento y G_{12} y G_{21} corresponden a haplotipos en fase de repulsión.

La significancia del desequilibrio de ligamiento entre ambos marcadores fue evaluada mediante un test de χ^2 según Lewontin (1988), utilizando la fórmula:

$$\chi^2 = \frac{D^2 N}{(p_1 p_2 q_1 q_2)}$$

, donde p_1 , p_2 , q_1 y q_2 corresponden a las frecuencias alélicas y N al número total de haplotipos.

6. RESULTADOS

Las proporciones de genotipos y alelos para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb se muestran en la tabla 4. Ambos marcadores demostraron ser polimórficos, con una proporción notoriamente mayor de los alelos de delección. Con respecto a la distribución genotípica para cada polimorfismo, se observaron tres genotipos diferentes (Del/Del; In/Del; In/In), con una gran proporción de animales homocigotas. En el caso del polimorfismo Indel-23pb el genotipo Del23/Del23 fue el mayoritario. En contraparte, para el polimorfismo Indel-12pb, si bien la proporción de animales de genotipo Del12/Del12 fue notoria, resultó coincidente con la proporción de heterocigotas y claramente superior al genotipo homocigota In12/In12.

Tabla 4. Proporciones genotípicas y alélicas para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb del gen *PRNP* en bovinos Aberdeen Angus.

Genotipos	Indel-23pb		Indel-12pb	
	Nº	%	Nº	%
Del/Del	372	58.6	287	45.2
In/Del	226	35.6	287	45.2
In/In	37	5.8	61	9.6
Alelos				
Del	76.38		67.2	
In	23.62		32.8	

En la tabla 5 se muestran los valores de diversidad y el p-valor de la prueba de χ^2 para el equilibrio génico de Hardy-Weinberg (H-W) de cada polimorfismo considerado. Ambos marcadores se encontraron en equilibrio de H-W. Los valores de heterocigocidad observada y esperada fueron muy similares, pero mayores para el marcador Indel-12pb. El estadístico F_{IS} fue próximo a cero para ambos marcadores, positivo en el caso del polimorfismo Indel-23pb y negativo para el Indel-12pb.

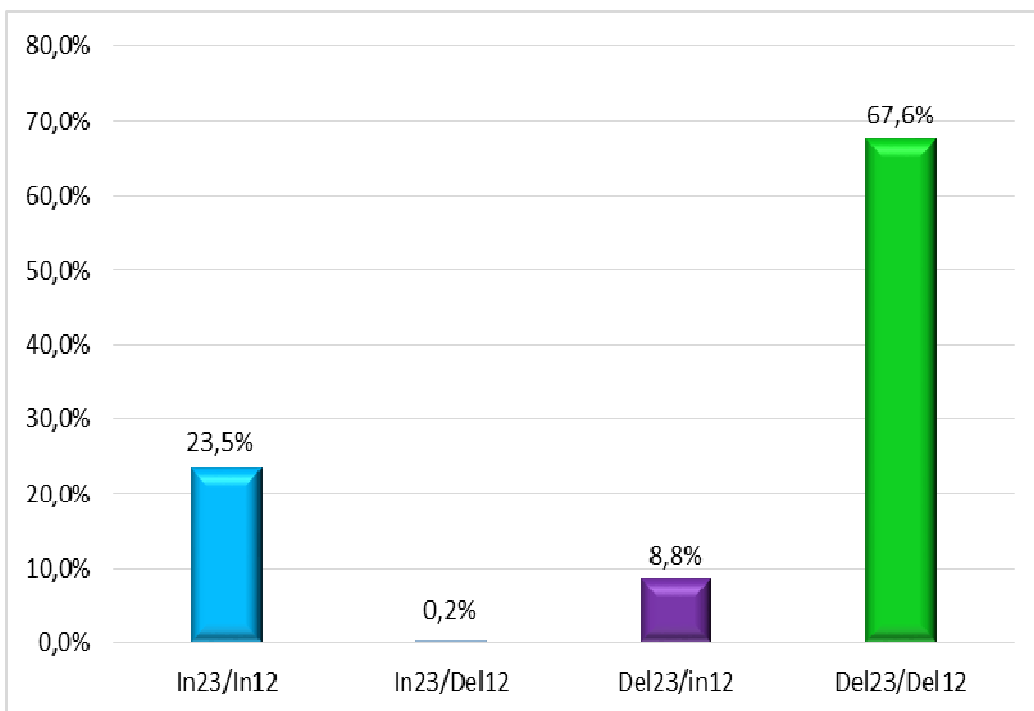
Los dos polimorfismos pueden combinarse dando lugar a cuatro haplotipos posibles. En el gráfico 1 se muestran las proporciones observadas para cada uno de ellos.

Tabla 5. Heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), estadístico Fis y p- valor de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb en bovinos Aberdeen Angus.

Polimorfismo	Ho	He	Fis	Equilibrio H-W (p-valor)
Indel-23pb	0.3559	0.3611	0.0145	0.7388*
Indel-12pb	0.4520	0.4370	-0.0343	0.4109**

* $\chi^2= 0.133$; ** $\chi^2= 0.745$.

Gráfico 1. Proporciones haplotípicas para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb en bovinos Aberdeen Angus.



El haplotipo mayoritario fue Del23/Del12 (67.6%) seguido del haplotipo In23/In12 (23.5%). Los dos haplotipos restantes fueron claramente minoritarios, siendo especialmente rara la forma haplotípica In23/Del12 que se observó en menos del 1% de la población. Ambos marcadores mostraron estar fuertemente ligados ($D=0.158$; $D'=0.99$; $\chi^2=812.8$ $P<0.001$).

En la tabla 6 se muestran los genotipos (diplotipos) observados en base a la combinación haplotípica.

Tabla 6. Proporciones diplotípicas para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb del gen *PRNP* en bovinos Aberdeen Angus.

Diplotipos	Nº	%
In23In12/In23In12	37	5.8
Del23In12/In23In12	20	3.1
Del23In12/Del23In12	5	0.8
Del23In12/Del23Del12	82	13
Del23Del12/ In23In12	204	32
Del23Del12/Del23Del12	285	45
Del23Del12 /In23Del12	2	0.3

Se reconocieron siete diplotipos diferentes, con una marcada predominancia de los genotipos Del23Del12/Del23Del12 y Del23Del12/In23In12. Los diplotipos In23Del12/Del23Del12 y Del23In12/Del23In12 fueron particularmente raros, observándose en menos del 1% de la población estudiada.

7. DISCUSIÓN

El genotipado para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb se ha realizado por varios autores utilizando diferentes técnicas o combinaciones de ellas. La aproximación metodológica más clásica consiste en un amplificado por PCR de la región que contiene el polimorfismo seguido de una electroforesis en gel (Artigas y col., 2011). Esto es posible dada la naturaleza del marcador que implica la deleción o inserción de varios pares de bases. En los últimos años el desarrollo de la genética molecular ha permitido la masificación de técnicas que por su elevado costo se encontraban restringidas en su uso. Así, se ha utilizado la espectrofotometría de masa para el genotipado de estos mismos marcadores (Juling y col., 2006) con eficiencias equivalentes al PCR clásico (Sanches y col., 2016), lo que permite una adecuada comparación entre los resultados. La plataforma de secuenciación contratada para realizar el genotipado de los animales de este trabajo utilizó la técnica de espectrofotometría de masa, analizando un total de 648 animales obteniendo ambos genotipos para 635 de ellos. Los animales que no pudieron ser genotipados para ambos marcadores (n=13) fueron excluidos del estudio.

La evaluación de las frecuencias alélicas para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb reveló una alta proporción de los alelos de deleción en la población Aberdeen Angus de Uruguay (AAU) (Del23: 76.38% y Del12: 67.8%), asociados a mayor susceptibilidad genética a la EEB (Sander y col., 2004; 2005; Hasse y col., 2007; Gurgul y col., 2012). Estas frecuencias son concordantes con las halladas previamente para la raza en Brasil por Kerber y col. (2008) (Del23: 73%; Del12: 56%). Sanches y col. (2016) reportan en el mismo país frecuencias altas del alelo Del23 (80.77%) sin embargo para el alelo Del12 las frecuencias son minoritarias (46.15%), esto podría explicarse por un reducido número de animales incluidos en el estudio (n=26 toros). Trabajos realizados en Aberdeen Angus de China reportan frecuencias similares (Del23: 78.5%; Del12:63%) (Zhu y col., 2011) a las reportadas por Kerber y col. (2008) y a las halladas en este estudio. Estos resultados se encuentran alineados con la mayoría de los trabajos realizados en la especie *Bos taurus*, donde se muestra predominantemente una alta frecuencia para el alelo de deleción (ver tabla 7). En este aspecto, uno de los casos más extremos es la raza Kuchinoshima de Japón en la que los alelos Del23 y Del12 se encuentran completamente fijados (Msalya y col., 2009).

No se han descrito en la bibliografía consultada razas *Bos taurus* en las que los alelos de inserción se encuentren fijados. Sin embargo, al comparar la población AAU con razas como el Bovino Criollo Uruguayo se observa que en estos animales los alelos de inserción para ambos marcadores resultan mayoritarios (in23: 62%; in12: 62%), lo que indicaría una elevada resistencia genética a la EEB (Artigas y col., 2011). Interesantemente, se ha observado que la frecuencia de los alelos de delección para ambos marcadores tiende a ser menor en las razas nativas (primitivas) que en las razas modernas, altamente seleccionadas (Gurgul y col., 2012; Artigas y col., 2011).

Al comparar las frecuencias alélicas de la población AAU con las halladas por Brunelle y col., (2008) en la subespecie *Bos indicus*, se observan coincidencias en lo que respecta al alelo Del23 (88%) pero discordancia para el alelo Del12 (13%). Estas diferencias pueden ser explicadas en parte, por la frecuencia de los haplotipos en las diferentes poblaciones y que serán discutidos más adelante. Para ambos polimorfismos estudiados en la raza AAU la población se encontró en equilibrio génico de Hardy-Weinberg (Indel-23pb $P=0.7388$; Indel-12pb $P=0.4109$) indicando ausencia de selección directa o indirecta sobre este gen. Esto es de esperarse si consideramos que la resistencia a la EEB no se encuentra incorporada dentro de los esquemas de selección para la raza y presumiblemente podría indicar además, ausencia de asociación con características de interés productivo.

En lo que respecta a las proporciones genotípicas en la población AAU, el genotipo Del23/Del23 fue el más frecuente (58.6%) superando incluso la suma de las proporciones de los dos genotipos restantes (41.3%). Esto es coincidente con lo descrito para las otras poblaciones Aberdeen Angus (Sanches y col., 2016; Zhu y col., 2011; Kerber y col., 2008). El genotipo Del12/Del12 se observó en alta frecuencia (45.2%) al igual que el genotipo Del12/In12 (45.2%). Altas frecuencias de heterocigotas para el polimorfismo Indel-12pb ya habían sido reportadas previamente en la raza (Sanches y col., 2016; Zhu y col., 2011; Kerber y col., 2008). Sin embargo, la frecuencia del genotipo Del12/Del12 resultó ser la más elevada entre las poblaciones Aberdeen Angus estudiadas y una de las más altas entre las razas *Bos taurus* (ver tabla 7). Esto es de importancia si consideramos que los genotipos Del/Del para ambos marcadores se vieron sobrerrepresentados en los

grupos de animales afectados por EEB con respecto al grupo control de animales sanos (Gurgul y col., 2012; Hasse y col., 2007; Sander y col., 2004).

Para cada marcador los valores de H_o y H_e fueron muy similares, lo cual es de esperarse teniendo en cuenta que la población se encuentra en equilibrio génico de H-W. Los valores de diversidad media (H_o media y H_e media) fueron de 0.4, indicando niveles medios a altos de diversidad si consideramos que se trata de loci dialélicos. Estos resultados son concordantes a los reportados previamente para la raza en Uruguay (H_o media: 0.36; H_e media: 0.37) al estudiarse 10 SNPs localizados en 8 genes (De Soto, 2015).

El estadístico F_{IS} fue bajo (próximo a cero) para ambos polimorfismos; positivo para el marcador Indel-23pb (de la mano del número de homocigotas) y negativo para el marcador Indel-12pb (asociado al número de heterocigotas). De todas formas, estas cifras no se apartan mayormente de cero en acuerdo a la situación de equilibrio génico de H-W que caracteriza a estos marcadores en la población AAU.

Al igual que en todas las razas bovinas, ambos marcadores demostraron estar fuertemente ligados ($D' = 0.99$ $P < 0.001$). Esto se fundamenta en la escasa distancia física (~2-Kpb) que los separa dentro de la estructura del gen *PRNP* (Brunelle y col., 2008).

La combinación de los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb da lugar a la formación de cuatro haplotipos posibles. En el caso de la población AAU se observaron todas las formas haplotípicas, siendo mayoritario el Del23/Del12 (67.6 %). Estos resultados coinciden con los reportados para la raza en china (Zhu y col., 2011) y Brasil (Kerber y col., 2008), así como en la mayoría de las razas *Bos Taurus* de la literatura consultada (ver tabla 8). La frecuencia del haplotipo explicaría la alta frecuencia del alelo Del23 discutida anteriormente y probablemente pueda deberse a un efecto fundador y deriva génica en el tronco común de las razas *Bos taurus* comparadas en este trabajo. La cercanía física no habría permitido una recombinación significativa entre los marcadores y una consecuente separación en las sucesivas generaciones. Esto puede verse claramente si observamos la frecuencia de los haplotipos In23/Del12 y Del23/In12 que fueron más raros (sobre todo el In23/Del12) en la población AAU, así como en la mayoría de las razas *Bos taurus* que lucen en la tabla 8.

Tabla 7. Proporciones alélicas y genotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb en razas *Bos taurus*.

Raza	País*	N	Genotipos Indel-23pb (%)			Alelos Indel-23pb (%)		Genotipos Indel-12pb (%)			Alelos Indel-12pb (%)		Referencia
			+/+	+/-	-/-	+	-	+/+	+/-	-/-	+	-	
Aberdeen Angus	CN	30	3,00	37,00	60,00	21,50	78,5	17,00	40,00	43,00	37,00	63,00	Zhu y col. (2011)
Aberdeen Angus	BR	99	4,00	46,00	50,00	27,00	73,00	22,00	44,00	34,00	44,00	56,00	Kerber y col. (2008)
Aberdeen Angus	BR	26	7,69	23,08	69,23	19,23	80,77	26,92	53,85	19,23	53,85	46,15	Sanches y col. (2016)
Aberdeen Angus	UY	635	5,80	35,60	58,60	23,62	76,38	9,60	45,20	45,20	32,20	67,80	Presente estudio
Bov. Criollo Uruguayo	UY	48	42,00	40,00	18,00	62,00	38,00	41,50	41,50	17,00	62,00	38,00	Artigas y col. (2011) ^p
Braunvieh	DE	42	33,30	52,40	14,30	60,00	40,00	66,60	33,30	0,00	83,40	16,60	Kashkevich y col. (2007)
Charolais	BR	82	10,00	44,00	46,00	32,00	68,00	18,00	48,00	34,00	42,00	58,00	Kerber y col. (2008)
Fleckvieh	DE	136	10,30	43,40	46,30	32,00	68,00	15,30	45,30	39,40	38,00	62,00	Juling y col. (2006)
Fleckvieh	CN	30	3,00	27,00	70,00	16,50	83,5	3,30	33,30	63,30	20,00	80,00	Zhu y col. (2011)
Fleckvieh	DE	36	11,00	36,00	53,00	29,00	71,00	19,00	32,00	49,00	35,00	65,00	Kashkevich y col. (2007)
Fleckvieh	BR	25	8,00	52,00	40,00	34,00	66,00	12,00	60,00	28,00	42,00	58,00	Sanches y col. (2016)
Fleckvieh	DE	60	11,70	38,30	50,00	30,80	69,20	21,70	31,70	46,70	37,50	62,5 p	Hasse y col. (2007)
German Brown	DE	87	44,80	41,40	13,80	65,00	35,00	74,40	22,20	3,30	85,00	15,00	Juling y col. (2006)
German Brown	DE	41	26,80	58,50	14,60	56,10	43,90	68,30	31,70	0,00	84,10	15,90	Hasse y col. (2007)
Hanwoo	KR	107	18,70	43,90	37,40	40,70	59,30	19,60	48,60	31,80	43,90	56,10	Jeong y col. (2006)
Hanwoo	KR	437	20,00	49,00	31,00	44,00	56,00	21,00	47,00	32,00	44,00	56,00	Kim y col. (2009)
Hanwoo	KR	300	13,70	56,70	29,60	42,00	58,00	18,70	53,00	28,30	45,20	54,80	Choi y col. (2012)
Hereford	CN	30	0,00	3,30	96,70	1,70	98,30	3,30	16,70	80,00	11,60	88,40	Zhu y col. (2011)
Pardo Suizo	CH	103	40,80	40,80	18,40	61,20	38,80	57,30	39,80	2,90	77,20	22,80	Hasse y col. (2007)
Polish Red	PL	139	20,90	47,50	31,60	44,60	55,40	33,80	46,10	20,10	56,80	43,20	Czarnik y col. (2009)
PolishWhite-backed	PL	79	11,40	60,80	27,80	41,80	58,20	31,60	44,30	24,10	53,80	46,20	Czarnik y col. (2009)

* Código alfa-2 de país según Norma ISO 3166-1, CN: China, BR: Brasil, UY: Uruguay, DE: Alemania, KR: Corea del Sur, CH: Suiza, PL: Polonia. ^p Datos corregidos.

Continuación de tabla 7. Proporciones alélicas y genotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb en razas *Bos taurus*.

Raza	País*	N	Genotipos Indel-23pb (%)			Alelos Indel-23pb (%)		Genotipos Indel-12pb (%)			Alelos Indel-12pb (%)		Referencia
			+/+	+/-	-/-	+	-	+/+	+/-	-/-	+	-	
Holstein	UK	276	4,70	48,90	46,40	29,20	70,80	11,10	51,90	37,00	37,00	63,00	Juling y col. (2006)
Holstein	JP	863	5,00	32,00	63,00	21,00	79,00	7,20	38,00	54,80	26,00	74,00	Nakamitsu y col. (2006)
Holstein	KR	52	11,50	36,60	51,90	29,80	70,20	20,00	41,40	38,60	38,50	61,50	Jeong y col. (2006)
Holstein	DE	66	21,00	41,00	38,00	42,00	58,00	17,00	60,00	23,00	47,00	53,00	Kashkevich y col. (2007)
Holstein	DE	313	14,70	47,30	38,00	38,20	61,80	22,00	49,80	28,20	46,80	53,20	Juling y col. (2006)
Holstein	DE	80	8,80	48,80	42,50	33,00	67,00	11,25	55,00	33,75	33,70	61,30	Hasse y col. (2007)
Holstein	US	690	18,00	51,00	31,00	43,00	57,00	23,00	50,00	28,00	47,00	53,00	Brunelle y col. (2008)
Holstein	JP	65	18,50	52,30	29,20	45,00	55,00	41,50	33,90	24,60	58,00	42,00	Msalya y col. (2009)
Holstein	PL	510	11,40	50,00	38,60	36,40	63,60	19,40	54,50	26,00	44,70	53,30	Strychalsky y col. (2012)
Holstein	UY	30	7,00	53,00	40,00	33,50	66,50	16,50	49,50	34,00	41,00	59,00	Artigas y col. (2011) ^b
Holstein	PL	651	13,40	49,40	37,20	38,10	61,90	21,60	51,80	26,60	47,50	52,50	Gurgul y col. (2012)
Kuchinoshima	JP	52	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00	Msalya y col. (2009)
Swiss Schwarzfleck	CH	26	23,10	57,70	19,20	51,90	48,10	30,80	53,80	15,40	57,70	42,30	Hasse y col. (2007)
Wagyu Marrón	JP	98	19,00	50,00	31,00	44,00	56,00	23,00	47,00	30,00	47,00	53,00	Msalya y col. (2011)
Wagyu Marrón	JP	58	12,00	34,50	53,50	29,00	71,00	15,50	34,50	50,00	33,00	67,00	Msalya y col. (2009)
Wagyu negro	JP	120	8,00	30,00	62,00	23,00	77,00	23,00	38,00	39,00	42,00	58,00	Msalya y col. (2011)
Wagyu negro	JP	186	10,20	61,30	28,50	41,00	59,00	13,00	60,70	26,30	43,00	57,00	Nakamitsu y col. (2006)
Wagyu Negro	JP	153	4,60	34,60	60,80	22,00	78,00	29,40	50,30	20,30	55,00	45,00	Shimogiri y col. (2010)

* Código alfa-2 de país según Norma ISO 3166-1, UK: Reino Unido, JP: Japón, KR: Corea del Sur, DE: Alemania, US: Estados Unidos de América, PL: Polonia, UY: Uruguay, CH: Suiza. ^b Datos corregidos.

El haplotipo In23/In12, si bien no fue el minoritario, se observó con una baja frecuencia (23.5%). Este es un hecho contrastante con lo observado excepcionalmente en algunas razas *Bos taurus* como el Bovino Criollo Uruguayo, Pardo Suizo, German Brown y Swiss Schwarzfleck, donde las frecuencias del haplotipo In23/In12 se encuentran por encima del 50% (ver tabla 8). Estudios previos han asociado al haplotipo In23/In12 con una mayor resistencia genética a la EEB, mientras que el haplotipo Del23/Del12 se ha asociado a susceptibilidad (Gurgul y col., 2012; Sander y col., 2004; 2005; Hasse y col., 2007; Juling y col., 2006). El efecto de los haplotipos Del23/In12 e In23/del12 en lo que respecta a la EEB no ha podido comprenderse por completo, dada la baja frecuencia con la que se observa en las poblaciones *Bos taurus*. No obstante, Juling y col., (2006) plantean que el haplotipo Del23/In12 se comportaría como el In23/In12. En base a estos resultados, la población AAU presentaría una distribución de haplotipos desfavorables en relación a la susceptibilidad genética a la EEB, y que según lo visto en la tabla 8 no sería mayor al del resto de las razas *Bos taurus*.

Al comparar las frecuencias haplotípicas de la población AAU con las razas *Bos indicus* reportadas por Brunelle y col., (2008) sobresale una clara diferencia, puesto que el haplotipo mayoritario en estas últimas es Del23/In12 (75%), probablemente justificado por un efecto fundador en el tronco común de estas razas y escasa recombinación entre los marcadores.

De los 10 diplotipos posibles para los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb se observaron siete en la población AAU. Los diplotipos Del23In12/ In23Del12, In23Del12/ In23Del12, In23Del12/ In23In12 no fueron encontrados al igual que lo reporta Zhu et al. (2011), probablemente debido a las bajas frecuencias de los haplotipos In23Del12 y Del23In12 en ambas poblaciones. Kerber y col., (2008) encuentran ocho diplotipos, puesto que observan el In23Del12/ In23In12 pero en una frecuencia muy baja (1%). Los diplotipos más frecuentes en la población AAU fueron Del23Del12/Del23Del12 (45%) y Del23Del12/ In23In12 (32%). Estos resultados son comparables con los observados en la población Aberdeen Angus de Brasil (30 % y 29% respectivamente) (Kerber y col., 2008) y de China (43% y 30% respectivamente) (Zhu y col., 2011) y otras razas comerciales de *Bos taurus* como

Hereford (Zu y col., 2011), Fleckvieh (Zhu y col., 2011; Juling y col., 2006) y Holstein (Juling y col., 2006).

Los diplotipos que solo contienen alelos de delección se han visto sobrerrepresentados en el grupo de animales enfermos de EEB. Estudios realizados previamente demostraron que los animales con ese diplotipo presentaban de 1,76 (Juling y col., 2006) a 2,68 (Hasse y col., 2007) veces más riesgo de desarrollar EEB que los animales de diplotipo In23In12/In23In12. Incluso en la raza German Brown (en la que el haplotipo In23In12 fue el mayoritario), el diplotipo Del23Del12/In23In12 fue el más frecuente en los animales afectados de esa raza (Juling y col., 2006), remarcando la importancia del haplotipo Del23Del12 sobre la susceptibilidad a la enfermedad. En base a estos resultados, la población AAU presentaría una distribución diplotípica desfavorable en cuanto a la susceptibilidad genética a la EEB. No obstante es importante destacar que Uruguay nunca ha presentado casos de EETs en la historia, y las sólidas políticas de control orientadas a prevenir el ingreso de harinas de carne y hueso en los alimentos para rumiantes continúa siendo la medida más eficiente para prevenir y controlar la forma clásica de la EEB.

Tabla 8. Proporciones haplotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb en razas *Bos taurus*.

Raza	País*	N	Haplotipo (%)				Referencia
			In23/In12	In23/Del12	Del23/In12	Del23/Del23	
Aberdeen Angus	CN	30	21,7	0	15	63,3	Zhu y col. (2011)
Aberdeen Angus	BR	99	25	2	19	54	Kerber y col. (2008)
Aberdeen Angus	UY	635	23,5	0,2	8,8	67,6	Presente estudio
Bov. Criollo Uruguayo	UY	48	62	0	1	37	Artigas y col. (2011)
Charolais	BR	82	31	1	11	57	Kerber y col. (2008)
Fleckvieh	DE	136	32,6	0	5,4	62	Juling y col. (2006)
Fleckvieh	CN	30	14,8	1,9	5,2	78,1	Zhu y col. (2011)
Fleckvieh	PL	73	30,1	0	12,3	57,5	Gurgul y col. (2012)
Fleckvieh	DE	60	30,8	0	6,7	62,5	Hasse y col. (2007)
German Brown	DE	87	66,1	0	19,4	14,4	Juling y col. (2006)
German Brown	DE	41	56	0	28	16	Hasse y col. (2007)
Hanwoo	KR	107	40,4	0	3,9	54,8	Jeong y col. (2006)
Hanwoo	KR	437	42	3	2	53	Kim y col. (2009)
Hanwoo	KR	300	42	0	2	55	Choi y col. (2012)
Pardo Suizo	CH	103	60,7	0	17	22,3	Hasse y col. (2007)

* Código alfa-2 de país según Norma ISO 3166-1, CN: China, BR: Brasil, UY: Uruguay, DE: Alemania, PL: Polonia, KR: Corea del Sur, CH: Suiza.

Continuación de tabla 8. Proporciones haplotípicas para los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb en razas *Bos taurus*.

Raza	País*	n	Haplotipo (%)				Referencia
			In23/In12	In23/Del12	Del23/In12	Del23/Del23	
Hereford	CN	30	1,7	0	10	88,3	Zhu y col. (2011)
Holstein	UK	276	29,1	0	8,1	62,8	Juling y col. (2006)
Holstein	KR	52	29,8	1	8,7	61,5	Jeong y col. (2006)
Holstein	DE	313	39,1	0	9,1	51,3	Juling y col. (2006)
Holstein	DE	80	33,1	0	5,6	61,3	Hasse y col. (2007)
Holstein	US	690	43	0	4	52	Brunelle y col. (2008)
Holstein	JP	65	42	4	17	38	Msalya y col. (2009)
Holstein	PL	281	35,2	1,4	11,2	52,1	Czarnick y col. (2007)
Holstein	UY	30	33	2	10	55	Artigas y col. (2011)*
Holstein	PL	651	36,3	1,8	11,2	50,7	Gurgul y col. 2012
Kuchinoshima	JP	52	0	0	0	100	Msalya y col. (2009)
Polish Red	PL	139	44,6	0	12,6	42,8	Czarnik y col. (2009)
Polish Red	PL	104	48,6	0	16,8	34,6	Gurgul y col. (2012)
Polish White-backed	PL	79	33,4	9	21,7	35,9	Czarnik y col. (2009)
Swiss Schwarzfleck	CH	26	51,9	0	5,8	42,3	Hasse y col. (2007)
Wagyu Marrón	JP	58	15	18	20	47	Msalya y col. (2009)
Wagyu Negro	JP	153	22,1	0	22,7	55,2	Shimogiri y col. (2010)

* Código alfa-2 de país según Norma ISO 3166-1, CN: China, UK: Reino Unido, KR: Corea del Sur, DE: Alemania, US: Estados Unidos de América, JP: Japón, PL: Polonia, UY: Uruguay, CH: Suiza.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En relación a la estructura del gen PRNP en la población AAU y la susceptibilidad genética a la EEB, podemos concluir que:

- Las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y diplotípicas de los marcadores Indel-23pb e Indel-12pb no difieren de la reportada previamente para la raza en otros estudios.
- La distribución de las frecuencias alélicas, haplotípicas y diplotípicas de los marcadores considerados no difiere de las encontradas en la mayoría de las razas *Bos taurus* de la literatura consultada.
- La población AAU presenta altos niveles de susceptibilidad genética a la EEB (según la información disponible en la bibliografía) similares a otras poblaciones Aberdeen Angus (Brasil y China) y a la mayoría de las razas *Bos taurus* de la literatura consultada.
- La susceptibilidad genética solo es un componente que ayuda a comprender parte del comportamiento de la EEB, sin embargo, todas las medidas tomadas para evitar el contacto de los animales con el agente infeccioso continúan siendo las medidas más eficaces para controlar y prevenir la enfermedad.
- Varios autores han planteado la utilización de selección asistida por los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb, sin embargo, no existen trabajos de asociación directa o indirecta del gen *PRNP* con características de interés cárnico en bovinos. Estos estudios deberían realizarse para conocer el impacto favorable o desfavorable de los marcadores sobre esas características, previo a la selección asistida por ellos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar-Calvo, P., García, C., Espinosa, J. C., Androletti, O., Torres, J. M. (2015). Prion and prion-like diseases in animals. *Virus Res.* 207: 82-93.
2. Aguzzi, A., Calella, A. M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol. Rev.* 89(4): 1105-1152.
3. Aguzzi, A., Sigurdson, C., Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* 3: 11-40.
4. Aldhous, P. (1990). Spongiform encephalopathy found in cat. *Nature.* 345(6272): 194.
5. Alper, T., Haig, D. A., Clarke, M. C. (1978). The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid. *J. Gen. Virol.* 41(3): 503-516.
6. Alper, T. (1972). The nature of the scrapie agent. *J. Clin. Pathol.* 6 (supl): 154.
7. Alper, T., Haig, D. A., Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22(3): 278-284.
8. Anderson, R. A., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E. J., Watt, C.J., Udy, H.J., MaWhinney, S., Dunston, S.P., Southwood, T.R.E, Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M, Huinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R., Wells, G.A.H. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature.* 382(6594): 779-788.
9. Artigas, R., Llambí S., Postiglioni A. (2011). Análisis de polimorfismos del gen *PRNP* relacionados a la Encefalopatía Espongiforme Bovina en la raza Holando y Criollo del Uruguay. II Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Genética, Montevideo, Uruguay.

10. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D. F., McKinley M.P., Prusiner S.B., Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. 46(3): 417-428.
11. Baybutt, H., Manson, J. (1997). Characterisation of two promoters for prion protein (PrP) gene expression in neuronal cells. *Gene*. 184(1): 125-131.
12. Béringue, V., Andréoletti, O., Le Dur, A., Essalmani, R., Vilotte, J. L., Lacroux, C., Reine, F., Herzog, L., Biacabe, A., Baron T., Caramelli, M., Casalone, C., Laude, H. (2007). A bovine prion acquires an epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J. Neurosci*. 27(26): 6965-6971.
13. Biacabe, A. G., Morignat, E., Vulin, J., Calavas, D., Baron, T. G. (2008). Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001–2007. *Emerg. Infect. Dis*. 14(2): 298-300.
14. Biasini, E., Turnbaugh, J. A., Unterberger, U., Harris, D. A. (2012). Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci*. 35(2): 92-103.
15. Bishop, M. T., Ritchie, D. L., Will, R. G., Ironside, J. W., Head, M. W., Thomson, V., Bruce, M., Manson, J. C. (2008). No major change in vCJD agent strain after secondary transmission via blood transfusion. *PLoS One*. 3(8): e2878.
16. Bossers A, Schreuder BE, Muileman IH, Belt PB, Smiths MA. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* (77):2669-2673.
17. Boujon, C. L., Serra, F., Seuberlich, T. (2016). Atypical variants of bovine spongiform encephalopathy: rare diseases with consequences for BSE surveillance and control. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 158(3): 171-177.
18. Bradley, R., Collee, J. G., Liberski, P. P. (2006). Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 1. *Folia Neuropathol.* 44(2): 93-101.

19. Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*. 379(6563): 339-343.
20. Bravard, A., Auvré, F., Fantini, D., Bernardino-Sgherri, J., Sissoëff, L., Daynac, M., Xu Z., Etienne O., Dehen C., Comoy E., Boussin, F. D, Tell G., Deslys J.P., Radicella J.P. (2015). The prion protein is critical for DNA repair and cell survival after genotoxic stress. *Nucleic Acids. Res.* 43(2): 904-916.
21. Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Aguzzi, A. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.* 13(3): 310-318.
22. Brown, P., Bradley, R. (1998). 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *BMJ*. 317(7174): 1688-1692.
23. Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 389 (6650): 498-501.
24. Brunelle, B. W., Greenlee, J. J., Seabury, C. M., Brown, C. E., Nicholson, E. M. (2008). Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite cattle. *BMC Vet. Res.* 4(1): 36.
25. Budka, H., Will, R. G. (2015). The end of the BSE saga: do we still need surveillance for human prion diseases. *Swiss Med Wkly*. 145: w14212.
26. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 73: 1339–1347.
27. Capobianco, R., Casalone, C., Suardi, S., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Bruzzone, M. G. (2007). Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog.* 3(3): e31.

28. Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(9): 3065-3070.
29. Castle, A. R., Gill, A. C. (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front. Mol. Biosci.* 4:19.
30. Caughey, B. (2001). Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem. Sci.* 26(4): 235-242.
31. Choi, S., Woo H. J., Lee, J. (2012). Sequence variations of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in native Korean Hanwoo cattle. *J. Vet. Sci.* 13(2): 127-137.
32. Choi, S. H., Kim, I. C., Kim, D. S., Kim, D. W., Chae, S. H., Choi, H. H. y Park, H. S. (2006). Comparative genomic organization of the human and bovine *PRNP* locus. *Genomics.* 87(5): 598-607.
33. Cohen, O. S., Kimiagar, I., Korczyn, A. D., Nitsan, Z., Appel, S., Hoffmann, C., Chapman, J. (2016). Unusual presentations in patients with E200K familial Creutzfeldt- Jakob disease. *Eur. J. Neurol.* 23(5): 871-877.
34. Cohen, F. E., y Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 67(1): 793-819.
35. Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature.* 383 (6602): 685-690.
36. Come, J. H., Fraser, P. E., Lansbury, P. T. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(13): 5959-5963.

37. Comoy, E. E., Casalone, C., Lescoutra-Etcheagaray, N., Zanusso, G., Freire, S., Marcé, D., Auvre, F., Ruchoux, M.M., Ferrari, S., Monaco, S., Sale's, N., Caramelli, M., Leboulch, P., Brown, P., Lasme'zas, C., Deslys, J.P. (2008). Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PloS One*. 3(8): e3017.
38. Czarnik, U., Grzybowski, G., Zabołewicz, T., Strychalski, J., Kaminski, S. (2009). Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (*PRNP*) in Polish Red cattle, Polish White-backed cattle and European bison (*Bison bonasus* L., 1758). *Russ. J. Genet.* 45(4): 453-459.
39. Czarnik, U., Zabołewicz, T., Strychalski, J., Grzybowski, G., Bogusz, M., Walawski, K. (2007). Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (*PRNP*) in Polish Holstein-Friesian cattle. *J. Appl. Genet.* 48(1): 69-71.
40. De Soto, L. (2015). Genes relacionados a ternera y marmolado de la carne en la raza Aberdeen Angus en engorde a pasto natural y feedlot. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 43 pp.
41. Doetzelhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Seiser, C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol. Cell. Biol.* 19(8): 5504-5511.
42. Ducrot, C., Arnold, M., De Koeijer, A., Heim, D., Calavas, D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet. Res.* 39(4): 1-18.
43. Duffy, P. (1974). Possible person-to-person transmission of Creutzfeld-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 290: 692-693.
44. Eckroade, R. J., ZuRhein, G. M., Hanson, R. P. (1973). Transmissible mink encephalopathy in carnivores: clinical, light and electron microscopic studies in raccons, skunks and ferrets. *J. Wildl. Dis.* 9(3): 229-240.
45. Edmunds, D. R., Kauffman, M. J., Schumaker, B. A., Lindzey, F. G., Cook, W. E., Kreeger, T. J., Cornish, T. E. (2016). Chronic wasting disease drives population decline of white-tailed deer. *PloS One*. 11(8): eo161127.

46. Eiden, M., Hoffmann, C., Balkema-Buschmann, A., Müller, M., Baumgartner, K., Groschup, M. H. (2010). Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. *J. Gen. Virol.* 91(11): 2874-2883.
47. ENSEMBL. <http://www.ensembl.org> Fecha de consulta 12 de agosto de 2017.
48. Eraña, H. (2015). Estudio de los determinantes moleculares que modulan la resistencia del conejo a la infección por priones utilizando un modelo de propagación in vitro. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. 202 pp.
49. Faris, R., Moore, R. A., Ward, A., Race, B., Dorward, D. W., Hollister, J. R., Fischer E., Priola, S. A. (2017). Cellular prion protein is present in mitochondria of healthy mice. *Sci. Rep.* 7: 41556.
50. Fast, C., Groschup, M. H. Capítulo 2. (2013). Classical and atypical scrapie in sheep and goats. En: Zou, W.Q, Gambetti, P. Prions and Diseases. New York, Springer, V2, pp. 15-44.
51. Fernández-Borges, N., Erana, H., Venegas, V., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Castilla, J. (2015). Animal models for prion-like diseases. *Virus Res.* 207: 5-24.
52. Field, E. J. (1966). Transmission experiments with multiple sclerosis: an interim report. *BMJ.* 2(5513): 564.
53. Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., Alpers, M. (1967). Transmission and passage of experimental 'kuru' to chimpanzees. *Science.* 155(3759): 212-214.
54. Ghani, A. C., Ferguson, N. M., Donnelly, C. A., Anderson, R. M. (2000). Predicted vCJD mortality in Great Britain. *Nature.* 406(6796): 583-584.
55. Goldgaber, D., Goldfarb, L. G., Brown, P., Asher, D. M., Brown, W. T., Lin, S., Boellaard, J. W. (1989). Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome. *Exp. Neurol.* 106(2): 204-206.
56. Goldmann, W. (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet. Res.* 39:30.

57. Gurgul, A., Polak, M. P., Larska, M., Słota, E. (2012). *PRNP* and *SPRN* genes polymorphism in atypical bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in Polish cattle. *J. Appl. Genet.* 53(3): 337-342.
58. Haigh, C. L., Wright, J. A., Brown, D. R. (2007). Regulation of prion protein expression by noncoding regions of the *PRNP* gene. *J. Mol. Biol.* 368(4): 915-927.
59. Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G.G., Bayley, P. M. (2004). The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J. Mol. Biol.* 336(5): 1175-1183.
60. Halliez, S., Passet, B., Martin-Lannerée, S., Hernandez-Rapp, J., Laude, H., Mouillet-Richard, S., Vilotte, J.C., Béringue, V. (2014). To develop with or without the prion protein. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2:58.
61. Harris, D. A., Lele, P., Snider, W. D. (1993). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(9): 4309-4313.
62. Haase, B., Doherr, M., Seuberlich, T., Drögemüller, C., Dolf, G., Nicken, P., Schiebe, K., Ziegler, U., Groschup, M., Zurbriggen, A., Leeb, T. (2007) *PRNP* promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet.* 8:15.
63. Hoinville, L. J. (1994). Decline in the incidence of BSE in cattle born after the introduction of the 'feed ban'. *Vet. Rec.* 134(11): 274-275.
64. Iannuzzi, L., Palomba, R., Di Meo, G. P., Perucatti, A., Ferrara, L. (1998). Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (*PRNP*) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 81(3-4): 202-204.
65. Imran, M., Mahmood, S., Babar, M. E., Hussain, R., Yousaf, M. Z., Abid, N. B., Lone, K. P. (2012). *PRNP* gene variation in Pakistani cattle and buffaloes. *Gene.* 505(1): 180-185.

66. INAC. Disponible en:
https://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/14228/1/anuario-estadistico-2016_web-hojas-apaisadas.pdf Fecha de consulta: 26 de agosto de 2017.
67. Jeong, B. H., Lee, Y. J., Kim, N. H., Carp, R. I., Kim, Y. S. (2006). Genotype distribution of the prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms in Korean cattle. *Genome*. 49(12): 1539-1544.
68. Jin, H. J., Skripnitchenko, A., Koo, W. W. (2004). The effects of the BSE outbreak in the United States on the beef and cattle industry. Center for Agricultural Policy and Trade Studies, Department of Agribusiness and Applied Economics, North Dakota State University. Special report 03-4. Disponible en: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/23072/1/sr030004.pdf> . Fecha de consulta: 26 de agosto de 2017.
69. Juling, K., Schwarzenbacher, H., Williams, J. L., Fries, R. (2006). A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol*. 4(1): 33.
70. Kashkevich, K., Humeny, A., Ziegler, U., Groschup, M. H., Nicken, P., Leeb, T., Fischer, C., Becker, C., Schiebel, K. (2007). Functional relevance of DNA polymorphisms within the promoter region of the prion protein gene and their association to BSE infection. *FASEB. J*. 21(7): 1547-1555.
71. Kerber, A. R., Hepp, D., Passos, D. T., de Azevedo Weimer, T. (2008). Polymorphisms of two indels at the *PRNP* gene in three beef cattle herds. *Biochem. Genet*. 46(1-2): 1-7.
72. Kim, Y. C., Jeong, B. H. (2017). Lack of germline mutation at codon 211 of the prion protein gene (*PRNP*) in Korean native cattle. *Acta. Vet. Hung*. 65(1): 147-152.
73. Kim, Y., Kim, J. B., Sohn, H., Lee, C. (2009). A national survey on the allelic, genotypic, and haplotypic distribution of *PRNP* insertion and deletion polymorphisms in Korean cattle. *J. Genet*. 88(1): 99-103.

74. Kirkwood, J. K., Cunningham, A. A. (1994). Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet. Rec.* 135(13): 296-303.
75. Konold, T., Phelan, L. J., Clifford, D., Chaplin, M. J., Cawthraw, S., Stack, M. J., Simmons, M. M. (2014). The pathological and molecular but not clinical phenotypes are maintained after second passage of experimental atypical bovine spongiform encephalopathy in cattle. *BMC Vet. Res.* 10(1): 243.
76. Konold, T., Spiropoulos, J., Chaplin, M. J., Stack, M. J., Hawkins, S. A. C., Wilesmith, J. W., Wells, G. A. H. (2013). Unsuccessful oral transmission of scrapie from British sheep to cattle. *Vet. Rec.* 173(5): 118-118.
77. Küffer, A., Lakkaraju, A. K., Mogha, A., Petersen, S. C., Airich, K., Doucerain, C., Marpakwar, R., Bakirci, P., Senatore, A., Monnardi, A., Schiavi, C., Nuvolone, M., Grosshans, B., Homemann, S., Bassilana, F., Monk K.R., Aguzzi, A. (2016). The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Gpr126/Adgrg6. *Nature.* 536(7617): 464.
78. Lee, H. S., Sambuughin, N., Cervenakova, L., Chapman, J., Pocchiari, M., Litvak, S., Brown, P. (1999). Ancestral origins and worldwide distribution of the *PRNP* 200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64(4): 1063-1070.
79. Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, Hur MW. (2002). POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J. Biol. Chem.* 277: 26761-26768.
80. Leeming, J., Turner, P. (2004). The BSE crisis and the price of red meat in the UK. *Appl. Econ.* 36(16): 1825-1829.
81. Leopoldt, J. G. (1750). *Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Land-Wirthschafft: Fünf Theile; Mit Kupfer und Baurissen / durch Johann George Leopoldt, Hochreichsgräfl. Promnitz. Wirthschafftsamtmann der Herrschafft Sorau.* Disponible en: <http://digitale.bibliothek.uni-halle.de/vd18/id/7670817>. Fecha de consulta: 07 de marzo de 2017.

82. Lewontin, R. C. (1988). On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, 120(3): 849-852.
83. Liberski, P. P. (2012). Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol.* 50(1): 1-12.
84. Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development.* 115(1): 117-122.
85. Marsh, R. F., Hadlow, W. J. (1992). Transmissible mink encephalopathy. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics).* 11(2): 539-550.
86. Marsh, R. F., Bessen, R. A., Lehmann, S., Hartsough, G. R. (1991). Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J. Gen. Virol.* 72(pt 3): 589-594.
87. McHugh, P. C., Wright, J. A., Williams, R. J., Brown, D. R. (2012). Prion protein expression alters APP cleavage without interaction with BACE-1. *Neurochem. Int.* 61(5): 672-680.
88. Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., Manuelidis, L., Manuelidis, E. E. (1983). Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt–Jakob disease. *Nature.* 306(5942): 474-476.
89. Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.* 54(1): 63-74.
90. Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento de Brasil. Disponible en: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/CartilhaEETecnica.pdf/view> Fecha de consulta: 26 de mayo de 2017.

91. Morgan, N. (2001). Repercussions of BSE on international meat trade. Global market analysis. Commodities and Trade Division. Food and Agriculture Organisation. June. Disponible en: <http://www.fao.org/livestock/agap/frq/Feedsafety/pub/morgan%20bse.doc> .
Fecha de consulta 26 de agosto de 2017.
92. Murdoch, B. M., Murdoch, G. K. (2015). Genetics of prion disease in Cattle. *Bioinform. Biol. Insights*. 9(Suppl 4): 1-10.
93. Murdoch, B. M., Clawson, M. L., Yue, S., Basu, U., McKay, S., Settles, M., Capoferri, R., Laegreid, W. W., Williams, J. L., Moore, S. S. (2010). *PRNP* haplotype associated with classical BSE incidence in European Holstein cattle. *PLoS One*, 5(9): e12786.
94. Msalya, G., Shimogiri, T., Nishitani, K., Okamoto, S., Kawabe, K., Minesawa, M., Maeda, Y. (2010). Indels within promoter and intron 1 of bovine prion protein gene modulate the gene expression levels in the medulla oblongata of two Japanese cattle breeds. *Anim. Genet.* 41(2): 218-221.
95. Msalya, G., Shimogiri, T., Okamoto, S., Kawabe, K., Minezawa, M., Namikawa, T., Maeda, Y. (2009). Gene and haplotype polymorphisms of the Prion gene (*PRNP*) in Japanese Brown, Japanese native and Holstein cattle. *Anim. Sci. J.* 80(5): 520-527.
96. Nakamitsu, S., Miyazawa, T., Horiuchi, M., Onoe, S., Ohoba, Y., Kitagawa, H., Ishiguro, N. (2006). Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J. Vet. Med. Sci.* 68(1): 27-33.
97. Nicolas, O., Gavín, R., José, A. (2009). New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: The “ying and yang” of a relevant protein. *Brain Res. Rev.* 61(2): 170-184.
98. Nuvolone, M., Hermann, M., Sorce, S., Russo, G., Tiberi, C., Schwarz, P., Minikel, E., Despina Sanoudou, D., Pelczar, P., Aguzzi, A. (2016). Strictly co-isogenic C57BL/6J-*PRNP*^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science. *J. Exp. Med.* 213 (3): 313-327

99. Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Leroy, E.H., Prusiner, S. B., Weissmann, C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40(4): 735-746.
100. OIE. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/datos-especificos-de-eeb/numero-de-casos-en-el-reino-unido/>. Fecha de consulta: 26 de mayo de 2017.
101. Ono, F., Tase, N., Kurosawa, A., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Sato, Y., Tobiume, M., Hagiwara, M., Yamakawa, Y., Terao, K., Sata, T. (2011). Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate. *Jpn. J. Infect. Dis.* 64(1): 81-4.
102. Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Mohri S., Yokoyama, T., Czub, S. (2011). Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial-and stellate-type prion protein deposits. *Vet. Res.* 42(1): 79.
103. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A. N. A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R., Cohen F.E., Prusiner, S.B. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(23): 10962-10966.
104. Parkin, E. T., Watt, N. T., Hussain, I., Eckman, E. A., Eckman, C. B., Manson, J. C., Baybutt, H.N., Turner, A.J., Hooper, N. M. (2007). Cellular prion protein regulates β -secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(26): 11062-11067.
105. Pastrana, M. Á. (2008). Aislamiento y caracterización de una fracción de PrP^{Sc} resistente a proteinasa K (sPrP^{Sc}): estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 283 pp.
106. Pattison, J. (1998). The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 4(3): 390.

107. Pattison, I. H. (1972). Scrapie—a personal view. *J. Clin. Pathol.* 6(supl): 110-114.
108. Pattison, I. H. (1965). Resistance of the scrapie agent to formalin. *J. Comp. Pathol.* 75(2): 159-164.
109. Peralta, O. A., Huckle, W. R., Eyestone, W. H. (2012). Developmental expression of the cellular prion protein (PrPC) in bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 79(7): 488-498.
110. Pietrini, V., Puoti, G., Limido, L., Rossi, G., Di Fede, G., Giaccone, G., Mangieri, M., Tedeschi F., Bondavalli, A., Mancina, D., Bugiani, O. (2003). Creutzfeldt-Jakob disease with a novel extra-repeat insertional mutation in the *PRNP* gene. *Neurology.* 61(9): 1288-1291.
111. Polo, J. M. (2000). Historia y clasificación de las enfermedades priónicas humanas. *Rev Neurol.* 31(2): 137-41.
112. Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell.* 35(2): 349-358.
113. Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 216(4542): 136-144.
114. Rambold, A. S., Müller, V., Ron, U., Ben-Tal, N., Winklhofer, K. F., Tatzelt, J. (2008). Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions. *EMBO J.* 27(14): 1974-1984.
115. Richt, J. A., Hall, S. M. (2008). BSE case associated with prion protein gene mutation. *PLoS Pathog.* 4(9): e1000156.
116. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., Wüthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23–231). *FEBS Lett.* 413(2): 282-288.

117. Sanches, C. C., Rosinha, G., Galvão, C. E., Feijó, G. L., Araújo, F. R., Soares, C. O. (2016). Polymorphisms in the Prion Protein Gene of cattle breeds from Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 36(11): 1059-1066.
118. Sanches, C. C. (2014). Análise de polimorfismos no gene *PRNP* em raças bovinas no Brasil. Tesis Doctoral. Universidad Federal de Mato Grosso do Sul. Brasil. 95 pp.
119. Sánchez-Valle, R., Yagüe, J., Turón, A., Aróstegui, J. I., Nos, C., Rey, M., Ferrer I., Gelpi, E. (2012). Inherited prion disease with 4-octapeptide repeat insertion linked to valine at codon 129. *Brain.* 135(4): 212-212.
120. Sander, P., Hamann, H., Drögemüller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K., Leeb, T. (2005). Bovine prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms modulate *PRNP* expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem.* 280(45): 37408-37414.
121. Sander, P., Hamann, H., Pfeiffer, I., Wemheuer, W., Brenig, B., Groschup, M. H., Leeb, T. (2004). Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds. *Neurogenetics.* 5(1): 19-25.
122. Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B., Raab, W. H. M. (2008). The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res. Bull.* 77(6): 343-355.
123. Shimogiri, T., Msalya, G., Myint, S. L., Okamoto, S., Kawabe, K., Tanaka, K., Mannen, H., Minezawa, M., Namikawa, T., Amano, T., Yamamoto, Y., Maeda, Y. (2010). Allele distributions and frequencies of the six prion protein gene (*PRNP*) polymorphisms in Asian native cattle, Japanese breeds, and mythun (*Bos frontalis*). *Biochem. Genet.* 48(9-10): 829-839.
124. Sigurdson, C. J., Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br. Med. Bull.* 66(1): 199-212.
125. Soto, C., Satani, N. (2011). The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Trends Mol. Med.* 17(1): 14-24.

126. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 51(2): 229-240.
127. Strychalski, J., Czarnik, U., Zabołewicz, T. (2012). Abnormal segregation of alleles and haplotypes at the polymorphic site of the *PRNP* gene within promoter and intron 1 regions in Polish Holstein–Friesian cattle. *Biochem. Genet.* 50(7-8): 520-528.
128. Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey M.W., Morris, R. (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 22(14): 3591-3601.
129. Taylor, D. M., Woodgate, S. L., y Atkinson, M. J. (1995). Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Vet. Rec.* 137(24): 605-610.
130. Uehlinger, F. D., Johnston, A. C., Bollinger, T. K., Waldner, C. L. (2016). Systematic review of management strategies to control chronic wasting disease in wild deer populations in North America. *BMC Vet. Res.* 12(1): 173.
131. Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., R.G, Taraboulos A., Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(25): 14945-14949.
132. Vilotte, J.L., Soulier. S., Essalmani, R., Stinnakre, M.G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J.C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M.F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J. Virol.* 75: 5977-5984.
133. Vital, A., Laplanche, J. L., Bastard, J. R., Xiao, X., Zou, W. Q., Vital, C. (2011). A case of Gerstmann–Sträussler–Scheinker disease with a novel six octapeptide repeat insertion. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37(5): 554-559.

134. Weissmann, C. (1999). Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Biol. Chem.* 274(1): 3-6.
135. Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121(18): 419-420.
136. Whitehouse, I. J., Brown, D., Baybutt, H., Diack, A. B., Kellett, K. A., Piccardo, P. y Hooper, N. M. (2016). Ablation of Prion Protein in Wild Type Human Amyloid Precursor Protein (APP) Transgenic Mice Does Not Alter The Proteolysis of APP, Levels of Amyloid- β or Pathologic Phenotype. *PLoS One.* 11(7): e0159119.
137. Whitehouse, I. J., Miners, J. S., Glennon, E. B., Kehoe, P. G., Love, S., Kellett, K. A., Hooper, N. M. (2013). Prion protein is decreased in Alzheimer's brain and inversely correlates with BACE1 activity, amyloid- β levels and Braak stage. *PLoS One*; 8(4): e59554.
138. Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128(9): 199-203.
139. Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123(25): 638-644.
140. Williams, E. S., Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16(1): 89-98.
141. Yamakawa, Y., Hagiwara, K. I., Nohtomi, K., Nakamura, Y., Nishijima, M., Higuchi, Y., Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health. (2003). Atypical Proteinase K-Resistant Prion Protein (PrPres) Observed in an Apparently Healthy 23-Month-Old Holstein Steer. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56(5/6): 221-222.

142. Zahn, R. (2003). The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J. Mol. Biol.* 334(3): 477-488.
143. Zhu, X. Y., Feng, F. Y., Xue, S. Y., Hou, T., Liu, H. R. (2011). Bovine spongiform encephalopathy associated insertion/deletion polymorphisms of the prion protein gene in the four beef cattle breeds from North China. *Genome.* 54(10): 805-811.
144. Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J. D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M. T., Liautard, J. P. (2007). Physiological role of the cellular prion protein. *Vet. Res.* 39(4): 1