

LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS, UN MODELO DE INFECCIÓN PARADÓJICA

JUAN JOSÉ BADIOLA DIEZ

Discurso de Ingreso como Académico de Honor de la Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental

La proteína prión es la responsable de un grupo de enfermedades neurodegenerativas letales, conocidas como Enfermedades priónicas o Encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), que afectan no solamente a humanos sino también a diferentes especies de animales, tanto domésticos como salvajes (Prusiner 1982; Prusiner 1986; Prusiner, 1998), siendo el Scrapie la enfermedad prototipo y la que se conoce desde hace más tiempo (descrita en 1732). Éstas presentan una serie de hechos comunes, aunque no únicos, entre los que destacan la formación de vacuolas en las células del sistema nervioso, pérdida de neuronas, hipertrofia e hiperplasia de astrocitos, y acúmulos de la proteína prion patológica (PrP^{res} o PrP^{sc}).

Estas enfermedades han sido descritas en animales y personas. Las enfermedades animales se propagan por medio de una transmisión entre individuos de la misma o distinta especie, asumiendo como causa habitual la ingesta de alimento contaminado. Aunque genéricamente se las considere como “infecciones” no lo son en el sentido convencional, ya que el agente infectante no se reproduce a sí mismo en la célula huésped, sino que induce a que una proteína inocua (PrP^c) normalmente presente en las células se convierta en patógena. Así, ambas proteínas, aunque muy parecidas en su estructura química, no son la misma molécula, ya que ambas proteínas tienen una diferente configuración espacial.

Especies animales afectadas y etiopatogenia

ENFERMEDAD	ESPECIE	ETIOPATOGENIA
EEB	Bovino	Infección
Scrapie	Ovino y caprino	Infección
CWD	Cervidos	Infección
ETV	Visones	Desconocida
EEF	Felinos	Infección

EEB = Encefalopatía espongiiforme bovina. CWD = Caquexia crónica del ciervo.

ETV = Encefalopatía transmisible del visón. EEF = Encefalopatía espongiiforme felina

En lo que se refiere a las EET humanas, la etiología es más variada, ya que pueden ser infecciosas, hereditarias y esporádicas. Las infecciosas, no sólo son ritualistas como el Kuru (los nativos de la tribu Fore de las tierras altas de Nueva Guinea consumía, por costumbres rituales, el cerebro de sus difuntos), sino que un porcentaje importante, dentro de la rareza de este tipo de patologías, puede ser de origen Iatrogénico (tratamiento con hormonas de crecimiento, trasplante de médula u otro tipo de operaciones quirúrgicas cuando el material no ha sido esterilizado adecuadamente para eliminar el prión) o por ingesta de alimento contaminado con proteína prión de origen animal. Las hereditarias, conllevan modificaciones en el gen de la proteína y pueden ser inserciones y mutaciones.

Enfermedades humanas y etiopatogenia

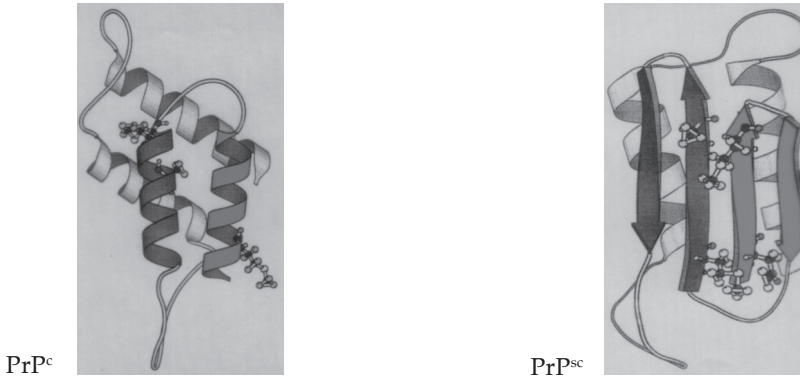
ENFERMEDAD	ETIOPATOGENIA
Kuru	Infección. Canibalismo ritualista
Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (i-ECJ)	Infección por contaminación priones (hormona del crecimiento)
Variante de Ceutzfeldt-Jakob (v-ECJ)	Infección por priones ¿bovinos?
Creutzfeldt-Jakob familiar (f-ECJ)	Hereditaria
Creutzfeldt-Jakob esporádico (s-ECJ)	Mutación somática o ¿Conversión de PrP ^c en PrP ^{sc} ?
Gerstman-Sträussler-Sheinker (GSS)	Hereditaria
Insomnio familiar fatal (FFI)	Hereditaria
Insomnio esporádico fatal (FSI)	Mutación somática o ¿Conversión de PrP ^c en PrP ^{sc} ?

EL AGENTE CAUSAL

Estas enfermedades están originadas por un agente transmisible de propiedades singulares entre las que destacan los largos periodos de incubación (meses, años e incluso décadas), la resistencia a altas temperaturas, a los rayos ultravioletas y a las radiaciones ionizantes así como a la inactivación con diversos productos químicos. Estas propiedades son incompatibles con la presencia de ácidos nucleicos, lo cual hizo sospechar que el agente causante de estas enfermedades transmisibles carecía de material genético. Ello dio lugar a la especulación sobre su naturaleza, y así se propusieron inicialmente varias hipótesis sobre su origen molecular, considerándolo simplemente como un “polisacárido replicante (Alper *et al.*, 1967), un ácido nucleico y una proteína (Weissmann, 1991) o solamente por proteínas (Prusiner, 1982), o bien un virus lento, un viroide o un virino (Dickinson and Outram, 1988). De todas las hipótesis planteadas sobre el origen de la enfermedad, la única aceptada actualmente es la propuesta por Prusiner en 1982, (“solamente es una proteína”) que cuenta con gran número de evidencias experimentales, aunque no obstante presenta aspectos controvertidos como que todavía no se ha podido cristalizar, la existencia de diversas cepas del agente causal (Safar, 1998) o el hecho de que la infectividad no esté siempre asociada a la PrP^{sc} (Lasmezas *et al.*, 1997). Ello ha dado pie a que algunos autores argumenten que además de la proteína debe existir algo más, así Aiken *et al.*, 1989 y Manuelidis, 2007, entre otros, han mantenido durante largos años que la proteína envuelve un fragmento del DNA mitocondrial.

La hipótesis predominante de estar constituidos “solamente por una proteína” fue inicialmente propuesta por Griffith en una publicación en *Nature* en el año 1967 (Griffith, 1967). Pero no fue hasta 1982 cuando Stanley B. Prusiner actualizó y enunció de forma detallada esta teoría provocando con ello un debate en la comunidad científica, al afirmar que el agente infeccioso responsable de estas enfermedades degenerativas del sistema nervioso central en animales y más raramente en el hombre, era simplemente una proteína a la cual le dio el nombre de prión “*Proteinaceous infectious particle*” (PrP), contraviniendo con ello una creencia, hasta entonces admitida por la comunidad científica de que todo agente responsable de enfermedades transmisibles necesita material genético (DNA o RNA), imprescindible para que la enfermedad prevalezca en el huésped. La conversión de la proteína PrP^c (proteína celular normal) en PrP^{sc} (isoforma anormal causante de la enfermedad), implica un cambio en la conformación de la primera, de forma que el contenido en α -hélice disminuye mientras

que aumenta el contenido en hoja plegada β , aunque ambas proteínas tienen la misma secuencia de aminoácidos. Existen abundantes apoyos experimentales para asegurar que la proteína celular de membrana (PrP^c) y la proteína prión patológica (PrP^{sc}) tienen la misma estructura primaria (Prusiner, 1990). Por lo tanto, se acepta que la estructura primaria de la PrP^c puede adoptar dos diferentes conformaciones que explican la existencia de PrP^c y PrP^{sc} (Borchelt *et al.*, 1990; Pan *et al.*, 1993). Cuando las dos estructuras secundarias se comparan por técnicas espectroscópicas, FTIR (*Fourier Transformer Infrared*) y RMN (Resonancia Magnética Nuclear; Pan *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995) muestran que la proteína celular (PrP^c) tiene un 40% de estructura en α -hélice, y apenas un 3% de hoja plegada en β , mientras que la proteína isoforma patológica (PrP^{sc}) tiene un 30% de α -hélice, y un 40% de hoja plegada en β .



Estudios comparativos de ambas proteínas con marcadores metabólicos demuestran que el cambio de conformación es un proceso post-traducciona que conlleva un cambio drástico en las propiedades de la proteína (Pan *et al.*, 1993). Así, mientras que la proteína normal celular es soluble en detergentes suaves no desnaturizantes y se digiere fácilmente con proteasas (proteínaasa K), la isoforma patológica es resistente a los detergentes y sólo es parcialmente digerida por proteasas produciendo la isoforma conocida como PrP^{sc} 27-30, llamada así debido a que deriva de la PrP^{sc} y que su tamaño es de 27-30 Kd (Prusiner *et al.*, 1998).

El gen que codifica a la proteína celular PrP^c se expresa de forma constitutiva en tejidos neuronales y no neuronales de los animales adultos, pero se encuentra bajo un control muy riguroso durante el desarrollo embrionario (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985; Prusiner and Scott, 1997). Los niveles más altos de mRNA y PrP^c se localizan en el tejido neuronal especialmente en el hipocampo,

y más específicamente en las sinapsis, mientras que existen niveles sensiblemente más bajos en otros tejidos y órganos como el corazón, músculo esquelético, hígado, adrenal o la glándula mamaria. Los genes de la proteína PrP de humanos y ratones están localizados en los cromosomas homólogos 20 y 2 respectivamente, se han identificado en más de 15 especies de mamíferos y su secuencia genética está altamente conservada, con una homología del 90%. En casi todos ellos, el gen está compuesto por dos exones, uno de los cuales no se traduce, que se encuentran separados por un intrón de aproximadamente 10kb. Solamente tiene un marco de lectura (ORF) que en humanos (Kretzschmar *et al.*, 1986), hámster (Lowenstein *et al.*, 1990), ratón (Locht *et al.*, 1986), rata (Liao *et al.*, 1987) y oveja (Goldman *et al.*, 1988) ha sido secuenciado. La proteína que codifica tiene aproximadamente 250 aminoácidos, y está localizado a 10 nucleótidos del extremo 3' del aceptor de *splicing* (corte y empalme) del exón 2. En ratones, ovejas y ratas, el gen que codifica la PrP tiene 3 exones, siendo el exón 3 muy semejante al exón 2 de hámster (Westaway *et al.*, 1994). El promotor contiene regiones ricas en GC y carece de caja TATA, por lo que la región rica en G-C funciona como un posible sitio de unión del factor de transcripción SP1 (McKnight y Tjian, 1986).

Ante la incertidumbre causada por la dualidad conformacional de la proteína prión se han tratado de buscar, tanto en los genes humanos como en los ovinos, otros motivos genéticos que expliquen esta doble conformación, pero hasta la fecha no se han encontrado ni posibles exones, ni otros marcos de lectura (ORF) que permitan *splicing* alternativo, ni otros motivos genéticos que expliquen la existencia de estas dos proteínas de propiedades tan diferentes.

La síntesis de la proteína PrP^c se realiza en el retículo endoplasmático rugoso, en forma de una pre-proteína que consta de 254 aminoácidos (según la especie animal) y en la que se pueden destacar las siguientes características estructurales:

1. En el extremo amino-terminal, una secuencia señal de 22 aminoácidos (péptido señal).
2. Desde el aminoácido 51 al 91, cinco repeticiones de un octapéptido.
3. Un núcleo hidrofóbico de unos 30 aminoácidos (112 al 145) muy conservados en todas las especies de mamíferos.
4. Cuatro segmentos separados que, por estudios de predicción de modelos estructurales por ordenador, son candidatos para formar estructuras secundarias.

5. Tres aminoácidos susceptibles de glucosilarse: Asn 181, Asn 197 y Ser 232.
6. Dos Cys (179 y 214) que forman un puente di-sulfuro que estabiliza la molécula.
7. Una región hidrofóbica de 22-23 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal.

Una vez terminada la síntesis, la proteína sufre un proceso de maduración complejo, antes de convertirse en la proteína celular normal. El proceso de maduración empieza en el retículo endoplasmático rugoso y termina de completarse en el aparato de Golgi con el proceso de glicosilación.

El descubrimiento de la proteína prión supuso un gran avance para caracterizar la etiología de las EET al proporcionar un marcador molecular específico de dichas enfermedades. Así, aceptando como válida la teoría de Prusiner, por la que la PrP^{sc} es una variante conformacional de la PrP^c, los diferentes estudios de conversión postulan un modelo de propagación del prión que involucra una interacción proteína-proteína, entre la PrP^c del huésped y la PrP^{sc} externa, que actúa promoviendo la conversión de PrP^c a PrP^{sc} en un proceso autocatalítico, que a su vez procede muy eficientemente al interaccionar proteínas con la misma estructura primaria (Weber *et al.*, 2002). Sin embargo, el mecanismo concreto de formación de la PrP^{sc} todavía se desconoce. Algunos estudios especulan que esta proteína tiene una capacidad inherente para promover su propio cambio conformacional, mientras otros piensan que es necesaria una asociación de esta proteína con un agente infeccioso (proteína X) para su propagación (Prusiner, 1998; Lasmezas, 2003).

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento del papel de la proteína prión en las EET, la función biológica de la PrP^c no es del todo conocida. Sin embargo, se ha sugerido que debe jugar un importante papel en el mantenimiento y/o regulación de las funciones neuronales (Herms *et al.*, 1999). La mayoría de las funciones de la PrP^c que se proponen se han deducido de datos referentes a su localización, interacciones moleculares o efectos observados en su ausencia (Lasmezas, 2003). Según estudios recientes las funciones importantes de la PrP^c se relacionarían con la supervivencia celular (protección contra el estrés oxidativo y la apoptosis) y la adhesión celular (Cazaubon *et al.*, 2007). En relación con la supervivencia neuronal, se conocen las funciones pro o anti-apoptosis y de protección contra el estrés oxidativo, debido a la capacidad de la PrP^c para unirse al cobre, así como funciones en la transmisión sináptica, mediante la regulación de la concentración del cobre presináptico (Kovacs and Budka, 2008; Westergard *et al.*, 2007). En cuanto a la adhesión celular, se han

identificado diversas funciones según el tipo celular, participando en la diferenciación neuronal, la integridad de la barrera epitelial y endotelial, la migración transendotelial de monocitos y la activación de células T (Cazaubon *et al.*, 2007; Steele *et al.*, 2006). El papel de la PrP^c puede ser especialmente relevante en el estrés celular, tanto en inflamaciones como en infecciones. Además, se ha propuesto la participación de la PrP^c en la neurogénesis y neuritogénesis, sinaptogénesis, desarrollo axonal y en el mantenimiento de la sustancia blanca (Aguzzi *et al.*, 2008).

La homología de la PrP^c (hasta del 90%) tanto en su estructura primaria como tridimensional entre diferentes especies de mamíferos, explica en gran medida la facilidad de transmisión interespecífica (barrera de especie) de las cepas de priones (Beringue *et al.*, 2008). La presencia de la PrP^c en las células es necesaria para el desarrollo de las enfermedades priónicas y su nivel de expresión es inversamente proporcional al periodo de incubación y a la progresión de la enfermedad (Brandner *et al.*, 1996; Bueler *et al.*, 1993; Prusiner *et al.*, 1993). Es abundante en el sistema nervioso (tanto en su fase de desarrollo como en su madurez), especialmente en las neuronas y las células de la glía (Brown, 2001; Campbell *et al.*, 2001; Weissmann *et al.*, 1998), a nivel de la sinapsis, el soma, las dendritas y los axones (Aguzzi and Heikenwalder, 2006; Flechsig and Weissmann, 2004). Además del SNC, la PrP^c presenta altos niveles de expresión en el sistema linfocítico (SLR), principalmente en linfocitos y en células dendríticas foliculares (Aguzzi and Heikenwalder, 2006). El hecho de que la PrP^c sea muy abundante en el SNC y el SLR, revela el importante papel de éstos, como sistemas diana en este tipo de enfermedades. Aunque mediante métodos inmunoquímicos se ha detectado la proteína PrP^c en diversos órganos, en la mayoría de ellos no se han identificado las células que expresan dicha proteína. En ovinos se ha descrito una amplia distribución de la PrP^c por todo el organismo, detectándose cantidades variables en distintos tejidos (Horiuchi *et al.*, 1995; Moudjou *et al.*, 2001). Moudjou *et al.*, (2001) determinaron que el encéfalo es el tejido con mayor cantidad de PrP^c, detectándose en él de 20 a 50 veces más cantidad que en el resto de los tejidos analizados.

Le siguen de mayor a menor contenido en PrP^c el pulmón, músculo esquelético, corazón, útero, timo, lengua y páncreas. El contenido de PrP^c de estos tejidos parece ser similar entre diferentes ovejas, a diferencia de lo que ocurre con otros tejidos con bajos niveles de PrP^c, como por ejemplo el tracto gastrointestinal, en el que los niveles de PrP^c difieren de un animal a otro. Por el contrario, en riñón e hígado se encontraron niveles muy bajos de PrP^c, siendo el contenido de ésta en el hígado entre 564 a 16.000 veces menor que en el encéfalo. Sin embargo, que los tejidos cuya infecciosidad es alta (amígdala, timo, intestino y bazo) no presentan más PrP^c que tejidos considerados con escasa infecciosidad como el músculo esquelético y el corazón (Danner, 1993;

Hadlow *et al.*, 1982). Además de en los tejidos anteriores, se ha detectado PrP^c en glándulas salivares (Herrmann *et al.*, 2000), glándula mamaria y adrenal (Horiuchi *et al.*, 1995), así como en una amplia variedad de tejidos reproductivos que incluyen endometrio, miometrio, oviducto, ovario, líquido alantoideo y placenta (Evoniuk *et al.*, 2008). En esta última, parece que la expresión de la proteína PrP^c está sobrerregulada en el epitelio caruncular (Tuo *et al.*, 2001) durante la gestación ovina. Por otro lado, cada tejido presenta una proporción diferente de las 3 formas de la PrP^c (bi-, mono- y a-glicosilada), variando según el tejido o célula de que se trate, e incluso se sabe que para una misma forma puede existir una diferente movilidad electroforética dependiendo del tejido (Lawson *et al.*, 2005; Moudjou *et al.*, 2001). La existencia de PrP^c en todos estos tejidos indica que el agente del scrapie puede ser potencialmente capaz de replicarse en ellos (Horiuchi *et al.*, 1995).

A pesar de que hasta el momento las condiciones en que se produce la conversión de PrP^c a PrP^{sc} aún no se han aclarado, se sabe que es un proceso de naturaleza postraducciona que supone la adopción de una estructura mayoritariamente extendida (rica en láminas beta), frente a la estructura original principalmente helicoidal (rica en hélices alfa). Otro hecho indiscutible es la presencia necesaria de PrP^c para la replicación de la PrP^{sc}, puesto que se ha demostrado que al infectar ratones knock-out para PrP^c el proceso de conversión no se produce, es decir, no desarrollan la enfermedad (Bueler *et al.*, 1993). Se han descrito dos modelos para explicar el mecanismo de propagación de los priones. El primero, llamado "modelo de conversión asistida por molde", según el cual coexisten dos tipos de proteína PrP^c en equilibrio, una normal y otra mutada. La mutada es más susceptible al cambio de conformación y se transformaría en presencia de la PrP^c. Es decir, la PrP^{sc} que actúa como molde se asociaría a la molécula de PrP^c normal o mutada y le imprimiría su misma conformación anormal, para producir un heterodímero PrP^{sc}-PrP^c el cual se transformaría en dos moléculas de PrP^{sc}. Según este modelo, la formación de PrP^{sc} se realizaría de forma autocatalítica con propagación exponencial. Esto favorecería que la PrP^{sc} exógena iniciase una cascada de conversión de PrP^c a PrP^{sc} de manera gradual y sucesiva. En este modelo la PrP^{sc} sería muy similar a la PrP^c mutada ya que sería capaz de convertirla espontáneamente (Prusiner, 1991). El otro modelo llamado "nucleación-polimerización", se basa en que hay un equilibrio termodinámico entre ambas conformaciones la PrP^{sc} y la PrP^c, pero esta última está favorecida. La formación de un núcleo o semilla (agregado de PrP^{sc}) tras una fase de latencia y la posterior fase de crecimiento exponencial del polímero al que se le agregan más moléculas de PrP^{sc}, dan lugar a la formación de agregados tipo amilode. Estos grandes polímeros son capaces de inducir un cambio masivo sobre las moléculas normales, convirtiéndolas en moléculas de conformación

anómala. Los grandes polímeros altamente insolubles que se acumularían podrían llegar a fragmentarse y así formar nuevos núcleos que aceleran el proceso de replicación (Caughey, 2001; Come *et al.*, 1993). Ambos modelos pueden explicar las tres variantes patológicas de las enfermedades producidas por priones. Las patologías infecciosas serían el resultado de la presencia de una PrP^{sc} exógena, catalizadora de la formación del núcleo; las patologías hereditarias consistirían en una desestabilización de la estructura de la PrP^c o bien en una estabilización de la estructura de la PrP^{sc} favoreciendo la aparición del estado patológico. Por último, las enfermedades esporádicas surgirían por mutaciones somáticas en el gen de la PrP que facilitarían la formación de la PrP^{sc}.

PATOGENIA Y TRANSMISIÓN

La puerta de entrada más habitual del agente etiológico en los casos de EEB y Scrapie es la vía oral. Así, se acepta que se produce a través del consumo de piensos o leches maternizadas contaminados con la proteína prión (Wells y Wilesmith, 1995). En la enfermedad del Scrapie, otro de los procedimientos más importantes de acceso del agente es la ingesta de la placenta. También se contemplan otras vías en el caso de la enfermedad de Scrapie (la presencia de pequeñas heridas en la piel, por ejemplo), que también podrían contribuir a la entrada de la PrP^{sc} en animales de las especies ovina y caprina cuando están en contacto con otros animales infectados o simplemente por la contaminación presente en el medio en rebaños afectados de la enfermedad (Foster *et al.*, 1996; Van Keulen *et al.*, 2002).

En la infección natural, el agente causal penetra en el organismo por vía oral a través del tracto intestinal. Sin embargo, en los estudios experimentales se han descrito otras vías efectivas, como la intracerebral, la intraperitoneal, la intravenosa, la intraocular y conjuntival y a través de escarificaciones en la piel (Foster *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1996; Maignien *et al.*, 1999; Detwiler y Baylis, 2003; Mohan *et al.*, 2004). Los puntos de entrada del agente tras la ingestión de material contaminado pueden ser distintos, aunque siempre implican al sistema inmunitario (Mabbott y Bruce, 2001). Tanto en la EEB como en el Scrapie, la PrP^{sc} entra en el organismo principalmente a través del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) sobre todo a la altura del íleon, ya que éste alberga la placa de Peyer ileal, que actúa como tejido linfoide primario e involuciona con la edad. En consecuencia, parece que existe mayor susceptibilidad a contraer la enfermedad a edades tempranas (St Rose *et al.*, 2006). En el mecanismo de incorporación desempeñan un papel importante las células M, que se localizan

adyacentes a las placas de Peyer, intercaladas en el epitelio de recubrimiento intestinal. Las células M son enterocitos modificados (presentan linfocitos B subyacentes) capaces de captar proteínas sin su posterior degradación a fin de presentarlas como antígenos al sistema linforreticular. Así, la PrP^{sc} pasa al sistema linforreticular, donde se acumula y se replica en células macrofágicas y en células dendríticas foliculares (Mabbott y Bruce, 2001). Estos tipos celulares, junto con los linfocitos B, son cruciales en la patogenia de las EET. Estudios efectuados en ratones transgénicos demostraron que, en ausencia de linfocitos B, los ratones eran resistentes a la infección por PrP. Más tarde se demostró que la ausencia de linfocitos B impedía que maduraran las células dendríticas foliculares, evitando así que éstas acumularan la proteína prión (Klein et al., 1997). Asimismo, otros autores sostienen que la expresión de PrP^c en linfocitos B no es necesaria para que se produzca neuroinvasión (Aguzzi y Heikenwalder, 2006). Los folículos linfoides, estructuras en las que se encuentran las células dendríticas foliculares, son muy eficaces para la replicación de la PrP^{sc}. De hecho, se ha demostrado que la presencia de estas estructuras en localizaciones no habituales, como sucede en casos de inflamación crónica, permite la acumulación de PrP^{sc}. Eso hace que, por ejemplo, en las mamicis crónicas que cursan con la formación de folículos linfoides, pueda excretarse PrP^{sc} a través de la leche (por ejemplo, co-infección con lentivirus de los pequeños rumiantes) o, en el caso de nefritis crónicas, por la orina (Ligios *et al.*, 2005; Seeger *et al.*, 2005; Aguzzi, 2006). En resumen, las células M captan la PrP y la incorporan al tejido linfoide subepitelial (Mabbott y Bruce, 2001), donde son procesados por las células dendríticas foliculares.

La tonsila palatina se considera otro punto de entrada del agente; desde el punto de vista histológico, en este punto el tejido linfoide se caracteriza por intercalarse con epitelio escamoso del paladar. El objetivo del tejido linfoide en esta localización y en condiciones normales es la identificación de antígenos que penetren en el organismo por vía oral. Tras un tiempo de permanencia variable en dicho tejido, el agente se dirige al sistema nervioso central por dos rutas principales: una directa a través del sistema nervioso periférico y otra indirecta que implica la participación del sistema linforreticular (nódulos linfáticos, bazo, amígdalas) y del sistema nervioso periférico (Beekes y McBride, 2000; Mabbott y Bruce, 2001). En el caso del Scrapie se ha observado una amplia participación del sistema linforreticular (Van Keulen *et al.*, 2002), mientras que en la EEB esa participación es mínima (Van Keulen *et al.*, 2000). En el sistema linforreticular, la participación más relevante es la del bazo, aunque depende de la vía de inoculación (Maignien *et al.*, 1999; Hill y Collinge, 2003). Una vez que la PrP^{sc} está presente en el bazo, su concentración aumenta hasta estabilizarse, previamente a la neuroinvasión del sistema nervioso central (Hill y Collinge, 2003). De

hecho, en la enfermedad del Scrapie algunos autores señalan que el diagnóstico de la enfermedad tomando como muestras objeto de estudio tanto la médula oblongada como el sistema linforreticular (nódulo retrofaríngeo, tonsila palatina, biopsia de tercer párpado, por el tejido linfoide asociado a la membrana nictitante, o de mucosa rectal) permitiría diagnosticar también gran parte de los casos preclínicos, debido a la temprana distribución de la proteína prión en el tejido linforreticular (Monleón *et al.*, 2005; Langeveld *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Dennis *et al.*, 2009). No obstante, la replicación de la proteína prión en el sistema linforreticular no es requisito indispensable en todos los casos (Aguzzi, 2001; Ersdal *et al.*, 2005). De hecho, la participación del citado sistema puede verse influida por factores endógenos o exógenos (por ejemplo, dosis infectivas elevadas) al individuo (Fraser, 1996; Andreoletti *et al.*, 2000). Así, en animales de experimentación se ha descrito neuroinvasión de prión en ausencia de sistema linforreticular (Jeffrey *et al.*, 2002), realizándose el proceso directamente por transporte axonal (Race *et al.*, 2000).

En el caso de los pequeños rumiantes, la ruta de neuroinvasión de la proteína prión vara sustancialmente dependiendo del agente infeccioso implicado, de la especie del huésped y de la susceptibilidad genética propia del individuo (Beekes y McBride, 2000; Glatzel y Aguzzi, 2000; Van Keulen *et al.*, 2002; Heggebo *et al.*, 2003). Así, factores como el genotipo del huésped pueden hacerla variar considerablemente. En ovinos que portan los genotipos más resistentes al codón 136 del gen PRNP (por ejemplo, ARR), la implicación del sistema linforreticular en la replicación de la proteína prión es muy pequeña, y la neuroinvasión se produce sin que el sistema linforreticular acumule PrP^{sc} (Jeffrey *et al.*, 2002).

En la EEB, la replicación del prión se restringe al sistema nervioso central (Buschmann y Groschup, 2005), siendo mínima la replicación del prión en el tejido linforreticular. Es importante destacar que el tejido linfoide intestinal se extiende proximal y distalmente a lo largo del tracto gastrointestinal. En el sistema linforreticular la PrP^{sc} se distribuye por su extensión (sobre todo en la especie ovina, dependiendo también de genotipos específicos) y se transfiere al sistema nervioso entérico (Beekes y McBride, 2000), que se considera el punto de entrada del agente causal del Scrapie en el sistema nervioso, ya que se ha detectado PrP^{sc} en dicho sistema durante las primeras fases de la infección. No se conoce con precisión el mecanismo de transferencia del agente causal desde el sistema linforreticular al sistema nervioso central, pero diversos estudios sugieren que se produce desde las células dendríticas foliculares hasta las fibras nerviosas que inervan los folículos linfoides, siendo mayor la velocidad de neuroinvasión cuanto menor es la distancia topográfica entre estas

células y las terminaciones nerviosas (Heggebo *et al.*, 2003; Prinz *et al.*, 2003). La difusión del agente puede ser pasiva, desde las células degeneradas que lo liberan hasta las terminaciones nerviosas, o mediante el transporte de células móviles, como los macrófagos o las células dendríticas (Aguzzi, 2001). Inicialmente se pueden observar depósitos de PrP^{sc} en los ganglios de los plexos que se encuentran en el íleon, que se van distribuyendo progresivamente a lo largo de todo el sistema nervioso entérico, presentando un patrón de diseminación similar al del sistema linforreticular (Van Keulen *et al.*, 1999; Heggebo *et al.*, 2003). Desde el sistema nervioso entérico, utilizando estructuras nerviosas del sistema nervioso autónomo, y en concreto del sistema parasimpático, la PrP^{sc} podría llegar al sistema nervioso central por dos puntos: a través de la médula espinal a nivel torácico (columna intermediolateral, segmentos T5-L1) mediante el nervio esplácnico y los ganglios mesentéricos craneal y celiaco o a través de la médula oblongada, en el núcleo motor dorsal del nervio vago. Estos hallazgos han sido descritos en trabajos realizados sobre la distribución tisular de la PrP^{sc} mediante técnicas inmunohistoquímicas en modelos experimentales murinos (Beekes *et al.*, 1998; Beekes y McBride, 2000).

No obstante, los primeros lugares del sistema nervioso central donde se acumula la PrP^{sc}, tanto en casos naturales del Scrapie y de EEB como en diversos modelos experimentales, son la médula oblongada y la médula espinal torácica (Baldauf *et al.*, 1997; Jeffrey *et al.*, 2001). Una vez alcanzado el sistema nervioso central, el agente se disemina de forma ascendente y descendente a través del mismo (Kimberlin y Walker, 1980). Asimismo, desde la descripción de los primeros casos de Scrapie atípico, se sabe que en animales que presentan esta variante de la enfermedad, el depósito de PrP^{sc} no se realiza principalmente en la médula oblongada, sino que su mayor concentración de se localiza en el cerebelo (Benestad *et al.*, 2003).

Sin embargo, no se puede descartar que el proceso de neuroinvasión ocurra en parte por la fracción de PrP^{sc} que circula por la sangre, y que el agente acceda al encéfalo a través de este fluido (Maignien *et al.*, 1999; Aguzzi y Heikenwalder, 2006). En 2002 se publicaron trabajos que describen la transmisión del Scrapie mediante transfusiones sanguíneas (Hunter *et al.*, 2002), lo que reforzó la teoría de que la diseminación de esta proteína se produjese también por la vía hematogena. Por ello, esta vía de distribución del prión puede representar una ruta alternativa de neuroinvasión a la del sistema nervioso entérico/sistema nervioso autónomo, que se apoya en la descripción de la presencia de depósitos de PrP^{sc} en los órganos circunventriculares del cerebro, en los que la barrera hematoencefálica no existe (Siso *et al.*, 2009).

Otra vía de diseminación descrita ha sido la linfática, ya que se ha detectado PrP^{sc} en los senos subcapsulares de los ganglios linfáticos (Ersdal *et al.*, 2005).

Actualmente todavía no se conocen por completo las rutas naturales de transmisión de las EET. Se acepta que la transmisión horizontal se produce sobre todo mediante la excreción alimentaria y la ingestión oral, pero los largos periodos de incubación que caracterizan a estas enfermedades hacen que sea muy difícil relacionar los casos clínicos con sus fuentes de infección originales.

Los estudios epidemiológicos sugieren que la transmisión natural del Scrapie clásico ocurre principalmente por vía horizontal, ya sea por contacto directo entre animales o, indirectamente, mediante la contaminación del ambiente (Hoinville, 1996). Se ha observado que este tipo de transmisión se produce de forma natural cuando ovejas sanas sin ninguna exposición previa se ponen en contacto con ovejas infectadas de Scrapie (Ryder *et al.*, 2004). En consecuencia, se asume que la PrP^{sc} se elimina a través de excreciones (heces y orina) o secreciones (leche y saliva; Wrathall *et al.*, 2008).

Se estima que las principales fuentes de contaminación ambiental en la enfermedad de Scrapie son la placenta (Andreoletti *et al.*, 2002; Tuo *et al.*, 2002), las heces (Maignien *et al.*, 1999) y los canales de animales infectados (Miller *et al.*, 2004). En el Scrapie ovino se acepta la transmisión materna en condiciones naturales, aunque resulta difícil de evaluar, dado el posible contagio lateral entre animales de todas las edades. Existe una relativa incertidumbre respecto a la vía de infección de una oveja afectada de Scrapie hacia su descendencia y si la infección ocurre *in utero*, en el periodo post-natal o en ambos momentos. La transmisión vertical «pura», aquella que se produce *in utero*, nunca ha sido demostrada (Aitken, 2007). La presencia de PrP^{sc} e infectividad en la placenta, incluso en estados preclínicos de la enfermedad (Race *et al.*, 1998), sugiere que la transmisión tendría lugar desde las madres infectadas de Scrapie a su descendencia y a otros animales durante el período de parto a través de la placenta. Se ha observado que no todos los animales infectados acumulan PrP^{sc} en la placenta y que el mismo animal no acumula PrP^{sc} en todas las gestaciones (Race *et al.*, 1998). Dicha acumulación parece depender del genotipo del feto (Andreoletti *et al.*, 2002; Tuo *et al.*, 2002; Alverson *et al.*, 2006), ya que no se han detectado depósitos de PrP^{sc} en placentas de ovejas infectadas de Scrapie cuyo feto presenta genotipo resistente al Scrapie clásico. En las ovejas ARR/VRQ con Scrapie no se acumula PrP^{sc} en sus placentas, incluso cuando el genotipo fetal es VRQ/VRQ (considerado susceptible). Esto podría estar asociado a la falta de PrP^{sc} en el tejido linfoide en animales infectados con genotipo ARR/VRQ, y en consecuencia a una ineficiente diseminación de PrP^{sc} en la placenta (Lacroux *et al.*, 2007). Sin embargo,

la acumulación de PrP^{sc} en la placenta no sólo depende del genotipo de la madre y del genotipo del feto, sino también de la posición del feto en el útero. La proteína patológica puede estar presente en cotiledones de fetos con genotipos resistentes a Scrapie cuando se produce un parto múltiple, en que los fetos (con genotipo resistente y susceptible) están compartiendo el mismo cuerno uterino. Esto se podría explicar por la existencia de anastomosis sanguíneas entre cotiledones de los diferentes fetos (Alverson *et al.*, 2006). La duración de la exposición de los corderos a las placentas tras la época de partos afecta a la transmisión a la descendencia. Así, los corderos que se separan inmediatamente después del parto de sus madres infectadas de Scrapie y del rebaño presentan menos incidencia de Scrapie en la edad adulta que aquéllos que se separan más tarde o que los que no son segregados (Aitken, 2007). La progenie de ovejas que desarrollan Scrapie presenta más probabilidad de contraer la enfermedad que la procedente de ovejas aparentemente sin Scrapie, debido tanto a la influencia de la genética como a la transmisión de la enfermedad. No obstante, aunque de forma excepcional, existen animales nacidos de ambos padres infectados de Scrapie que no desarrollan la enfermedad. Cuando sólo uno de los padres está afectado, sobre todo si es el macho, el riesgo para la descendencia se reduce. En consecuencia, se acepta que la transmisión materna es mucho más importante que la paterna, aunque esta diferencia es menor si la progenie es separada tras el parto, protegiéndose de este modo de una posterior infección horizontal (Hoinville, 1996).

En el ganado vacuno, todas las evidencias indican que en condiciones naturales el agente de la EEB no se propaga horizontalmente en el entorno mediante excreciones y/o secreciones, ni verticalmente a través de transmisión materna (Curnow y Hau, 1996; Wrathall *et al.*, 2002). Así, se acepta que la epidemia de la EEB fue debida a la intervención humana, al utilizarse canales de animales infectados con priones para la producción de harinas de carne y hueso como fuente de alimentación del ganado vacuno. La retirada de estas harinas para la alimentación animal ha tenido un claro efecto sobre la incidencia de la EEB, que se ha reducido de forma drástica.

La transmisión materna y/o vertical en la EEB, desde la madre al ternero, parece ser muy rara o incluso inexistente en estadios tempranos de incubación de la enfermedad, pero el riesgo aumenta dependiendo del periodo transcurrido entre el nacimiento del ternero y el comienzo de los signos clínicos en la madre. Así, se considera que, en una vaca afectada de EEB que tenga el parto hasta seis meses antes o después de la aparición de los signos clínicos, la probabilidad de que su ternero adquiera la enfermedad aumenta considerablemente (Wilesmith *et al.*, 1997; Donnelly, 1999). Sin embargo, no se sabe si la transmisión puede ocurrir por vía transplacentaria

durante la gestación o tempranamente en el periodo posnatal a través de secreciones o excreciones maternas (Wrathall *et al.*, 2008).

Se han sugerido otras posibles vías de entrada de la PrP^{sc}, como la mucosa olfatoria en humanos (Zanusso *et al.*, 2003) o las heridas en la lengua en un modelo de enfermedad transmisible del visón (ETV) en hámsters (Bartz *et al.*, 2003).

FACTORES GENÉTICOS

Los factores genéticos que influyen en la susceptibilidad y el desarrollo de una EET animal continúan en estudio. Es una cuestión relevante, ya que el descubrimiento de un gen directamente implicado en el desarrollo de este grupo de enfermedades ha permitido la aplicación de un sistema de control mediante la selección de animales resistentes, lo que se ha llevado a cabo en la especie ovina en la Unión Europea.

El gen de la proteína prión (PRNP) tiene una longitud variable, entre 16.000 y 22.000 bases, y está formado por 2 o 3 exones (dependiendo de la especie), si bien toda la región codificante (ORF) se encuentra en un único exón. Este gen codifica una glicoproteína de membrana, la PrP^c, que posee entre 230 y 255 aminoácidos, y cuya secuencia está altamente conservada entre especies. Este gen se ha identificado en un gran número de especies, tanto domésticas como salvajes. La homología entre las distintas especies es muy elevada; así se sabe que un 94% de la secuencia nucleotídica de las especies bovina y ovina es idéntica y estas especies muestran una homología con el gen humano del 66,7 y el 65,4%, respectivamente. En relación con él se ha descrito un gran número de polimorfismos o variantes genéticas en distintas especies bien por mutaciones puntuales o por inserciones y deleciones.

El desarrollo de una EET de forma natural está muy influido por las alteraciones en el gen del hospedador que codifica para la proteína PrP (Hunter, 1997). Estos polimorfismos pueden influir en la conversión de PrP^c en la isoforma PrP^{sc} (Bossers *et al.*, 1997). Los mecanismos por los que una variante alélica individual conduce a una susceptibilidad alterada o a un cambio en el periodo de incubación no han sido bien definidos. Se ha propuesto que, en humanos, los polimorfismos del gen PRNP pueden presentarse en sitios críticos implicados en la transición de conformación de PrP^c a PrP^{sc} (Glockshuber *et al.*, 1999).

El gen de la proteína PrP^c humana se localiza en el cromosoma 20, tiene una longitud de 16.000 bases y codifica una proteína de 253 aminoácidos. Ciertas mutaciones dan lugar a un cambio aminoacídico que, al provocar una modificación conformacional

del plegamiento de la proteína prión, origina una EET. Se han observado mutaciones en las formas familiares de la ECJ, en el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) y en el insomnio familiar letal. En la actualidad se han descrito 25 mutaciones en el gen PRNP humano, pero no todas ellas ligadas al desarrollo de la enfermedad. La causa más frecuente de ECJ familiar es la mutación puntual en el codón 20, que aparece en más del 70% de las familias con ECJ hereditaria en todo el mundo.

La predisposición genética tiene su influencia en todos los tipos de ECJ (familiar, yatrogénica y esporádica). El codón 129 parece ser el que está implicado en esta predisposición. Así, los casos iatrogénicos resultantes del uso de la hormona del crecimiento están asociados con el genotipo homocigoto valina en este codón. Por otro lado, los casos de la v-ECJ han aparecido en individuos homocigotos metionina.

El gen que codifica para la proteína prión bovina tiene un tamaño de 20-22.000 bases y se encuentra en el cromosoma 13 (13q17). La secuencia aminoacídica de la proteína codificada difiere de la ovina en 7 u 8 posiciones. Como consecuencia de la epidemia de EEB sufrida en el Reino Unido, se han llevado a cabo diversos trabajos con el fin de detectar la base genética de esta enfermedad en la especie bovina, ya que la epidemiología de esta enfermedad hace pensar que, al igual que ocurre en otras especies (humanos u ovinos), existe un componente genético.

Se han descrito algunos polimorfismos en el gen PRNP de esta especie (W84R, G100S, K113R, V115M, H143R, S146N y N177S), pero la demostración de su relevancia respecto a la susceptibilidad frente a la EEB está todavía en fase de estudio (Heaton *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Recientemente, se ha demostrado la asociación entre la susceptibilidad a EEB y la inserción /delección de 12 y 23 pares de bases (pb) en la región promotora del gen PRNP (Juling *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2007). El mayor efecto lo produce la delección en homocigosis, tanto de las 12 como de las 23 pb.

Las primeras investigaciones destinadas a la identificación de una base genética que pudiera explicar la diferencia en cuanto a la susceptibilidad y al desarrollo de una EET se llevaron a cabo en la especie ovina. De hecho, la influencia de la genética del hospedador en esta especie es una de las mejor conocidas, incluso se han llegado a establecer relaciones entre algunos polimorfismos del gen PRNP y la susceptibilidad al Scrapie.

La revisión realizada por Kimberlin, en 1979, resume los conocimientos de la época respecto a la susceptibilidad o la resistencia genética frente la enfermedad, tanto experimental como natural. En esta revisión se hacía referencia a dos hechos fundamentales que ayudaron a comprender la complejidad de la enfermedad. Uno

de ellos consistía en proponer que los animales podían mostrar resistencia a la enfermedad, pero tal vez no a la infección, de forma que podrían existir animales que tuvieran un periodo de incubación más largo que su propia vida, pero no por ello dejar de transmitir el agente causal. Otro era la posibilidad de que los animales fueran resistentes a la única cepa utilizada en todos los experimentos realizados hasta el momento (SSBP-1), pero que no lo fueran para otras nuevas cepas de Scrapie todavía no caracterizadas.

El descubrimiento de un gen celular que codificaba la proteína PrP^c fue una de las aportaciones más importantes que revolucionó la genética del Scrapie (Oesch *et al.*, 1985). A partir de ese momento, todos los estudios de susceptibilidad genética a la enfermedad giraron en torno a diferentes polimorfismos descritos en el gen PRNP. A partir de esta información, se comprobó la existencia de un polimorfismo en el codón 171 que codificaba dos aminoácidos (glutamina/arginina) (Goldmann *et al.*, 1990). Pese a que en aquel momento se desconocía la importancia de este descubrimiento, el polimorfismo del codón 171 ha sido uno de los más importantes en el control del Scrapie, y está asociado, como se referirá más adelante, a la susceptibilidad o la resistencia a la enfermedad.

Aunque existen diferencias en la frecuencia de los haplotipos entre las razas ovinas y en los haplotipos asociados a la enfermedad, se han observado algunas características comunes entre ellas. Por ejemplo, el haplotipo VRQ está asociado a una alta incidencia de Scrapie y el haplotipo ARR a una incidencia baja; este último tiene un efecto dominante, ya que tanto los animales homocigotos como los heterocigotos presentan un menor riesgo de padecer la enfermedad. Respecto a los haplotipos AHQ, ARQ y ARH, su asociación con la enfermedad depende en gran medida de la raza (Dawson *et al.*, 1998).

En la especie ovina, el gen PRNP tiene un tamaño de 20.000 pb y codifica para una proteína de 256 aminoácidos. Este gen ha sido localizado en el cromosoma 13. El gen presenta un alto grado de polimorfismo, y hasta la fecha se han descrito 40 mutaciones que suponen un cambio aminoacídico en 27 codones distintos (Goldmann, 2008). La mayoría son raros y no se han asociado a ningún fenotipo de la enfermedad, ni en la infección natural ni en la experimental. Sin embargo, las variantes genéticas de los codones 136, 154 y 171 parecen tener influencia en la susceptibilidad a la enfermedad. Del conjunto total de posibles alelos (2x2x3), sólo cinco se detectan con una frecuencia relativamente alta. La forma original del gen parece ser la variante ARQ, habiéndose originado el resto de alelos mediante mutaciones puntuales. La frecuencia y la distribución de las distintas combinaciones varían según la raza. En

los últimos años se han publicado numerosos trabajos en los que se determina la distribución de estos alelos en otras razas europeas. Concretamente, parece ser que los alelos predominantes en las poblaciones ovinas españolas son ARQ, ARR, ARH (Acín et al., 2004a) y ARQ en las poblaciones ovinas afectadas por la enfermedad (Acín et al., 2004b). Resultados similares se han obtenido en la raza sarda italiana y en razas portuguesas. Según los datos obtenidos principalmente de razas británicas y francesas, existe una clara influencia del genotipo de PRNP para los codones 136, 154 y 171 en la susceptibilidad del animal a presentar el Scrapie clásico. El genotipo de PRNP se muestra como el principal factor asociado a la incidencia de esta enfermedad si se tiene contacto con el agente causal.

En la actualidad se considera que el alelo VRQ es el más estrechamente relacionado con la susceptibilidad al Scrapie. Los animales homocigotos para este alelo son los que presentan mayor riesgo. Los heterocigotos con el alelo resistente (ARR y AHQ) tienen menor riesgo. La forma original ARQ también se ha asociado a la susceptibilidad a presentar esta enfermedad, aunque con un menor riesgo o una penetrancia menor que el VRQ. Los alelos ARR y AHQ se han asociado a la resistencia a esta EET.

El grupo nacional de información de Scrapie establecido en el Reino Unido desarrolló una «guía universal para clasificar los 15 posibles genotipos del gen PRNP en niveles de riesgo». Con este objetivo, se establecieron distintas clasificaciones de genotipos teniendo en cuenta los alelos predominantes en las distintas razas. Los genotipos se agrupan en función del nivel de riesgo del animal y del de su posible progenie. Dawson *et al.* (1998) proporcionan las tablas de riesgos resaltando que las interpretaciones de esta clasificación están basadas en probabilidades y no en certezas. Las tablas se revisan de forma periódica y pueden estar sujetas a modificaciones. Las distintas agrupaciones de los genotipos se basan en el riesgo al desarrollo de la enfermedad (R) y han sido valoradas de R1 a R5. El riesgo R1, indica un riesgo muy bajo de desarrollar la enfermedad en el individuo y un riesgo muy bajo en la progenie de primera generación, el R2 expresa un riesgo bajo del individuo y de la progenie, el R3 un riesgo bajo individual, pero que el de la progenie puede aumentar en función del genotipo del otro parental, el R4 indica que la enfermedad puede ocurrir de forma ocasional y que la progenie tiene mayor riesgo que la del grupo anterior y el R5 implica el mayor riesgo de desarrollar Scrapie.

En los últimos años, como se ha adelantado, se han descrito casos de Scrapie cuyas características clínicas, patológicas, inmunoquímicas y estructurales difieren en gran medida de la enfermedad clásica. En la actualidad, se considera que estos casos

se han producido como consecuencia de la aparición de cepas atípicas de Scrapie diferentes de las descritas hasta ahora, denominadas genéricamente cepas clásicas.

La primera descripción de la presencia de cepas atípicas de Scrapie en Europa se realizó en Noruega con la que fue denominada como cepa Nor98. Una de las características más importantes del Scrapie atípico es estar asociado a animales con un genotipo resistente al Scrapie clásico, incluidos los ARR homocigotos. Además, pocos casos de Scrapie atípico están asociados al haplotipo sensible (VRQ). Del mismo modo, se ha observado una relación entre el polimorfismo 141 leucina (L) / fenilalanina (F) y la susceptibilidad a las cepas atípicas (Moum *et al.*, 2005).

Ante la imposibilidad de disponer de un método fiable para el diagnóstico *in vivo* de las EET, su control se debe realizar mediante la ejecución de una vigilancia activa y pasiva y como complemento, el genotipado se utiliza como una herramienta para pronosticar el riesgo de padecer la enfermedad. Los programas de vigilancia basados en el genotipo de los animales se están aplicando en diversos países y están dando resultados alentadores en el control del Scrapie clásico.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Las técnicas de diagnóstico de este grupo de enfermedades, se basan en la observación de las lesiones características de este grupo de enfermedades y en la detección de la PrP^{sc} en el sistema nervioso central, principalmente mediante técnicas inmunoquímicas (OIE, 2008). Al contrario que otras enfermedades, las enfermedades causadas por la proteína prión no se pueden diagnosticar mediante la mayoría de los métodos convencionales. Dado que el agente causal de las EET carece de ácidos nucleicos no se pueden utilizar técnicas como la PCR que se basan en la detección del genoma. Asimismo, los individuos infectados no reconocen como “extraña” la proteína PrP^{sc}, por lo que no se produce una respuesta inmunológica específica y no son aplicables técnicas serológicas. Tampoco existen técnicas *in vitro* para aislar el agente causal, por lo que el método utilizado para demostrar la infectividad del agente es la inoculación en animales de experimentación.

Los métodos laboratoriales de diagnóstico de las EET reconocidos oficialmente se realizan *post mortem* en muestras de tejido del sistema nervioso central (OIE, 2008). Actualmente no existe ningún test de diagnóstico de la EEB que se pueda aplicar en animales vivos. En el caso del Scrapie, dado que la PrP^{sc} se distribuye por el sistema linforreticular, la detección de esta proteína en tejido linfoide obtenido mediante

biopsias es el único método fiable de diagnóstico *in vivo* (Gavier-Widen *et al.*, 2005), aunque su sensibilidad no es del 100%.

Tradicionalmente, el diagnóstico de las EET se ha basado en la observación de las lesiones características de estas enfermedades mediante microscopía óptica. Estas lesiones se localizan exclusivamente en el sistema nervioso central (Wells y Wilesmith, 1995) y se caracterizan por una neurodegeneración esponjiforme, acompañada generalmente de gliosis, degeneración y pérdida neuronal y, en determinados casos, amiloidosis cerebral (Wells y McGill, 1992). La lesión característica es la vacuolización, generalmente bilateral y simétrica, del pericarion neuronal y del neuropilo de la sustancia gris (espongiosis) (Figs. 1A y 1B) localizada en regiones neuroanatómicas concretas (Wells y McGill, 1992; OIE, 2008; Ligios *et al.*, 2002). Entre éstas las principales son las astas dorsales en la médula espinal, el núcleo del tracto solitario, el núcleo dorsal del nervio vago, el núcleo del tracto espinal del nervio trigémino, los núcleos vestibulares y la formación reticular en la médula oblongada, la sustancia gris central en el mesencéfalo, el área paraventricular en el hipotálamo y el tálamo y el área septal. Con menor frecuencia e intensidad se pueden observar también vacuolizadas otras áreas del sistema nervioso central como el hipocampo, corteza cerebelar o cerebral y los núcleos basales (Wells *et al.*, 1991; Wells y Wilesmith, 1995).

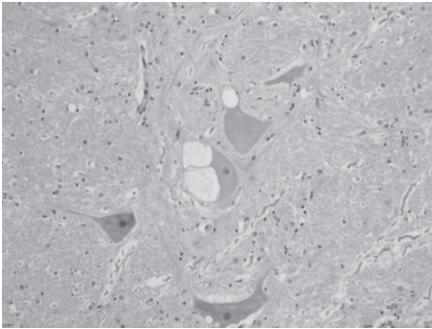


Fig. 1A: Vacuolización del pericarion neuronal de una oveja afectada de Scrapie

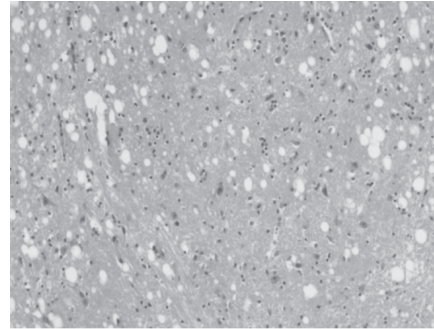


Fig. 1B: Vacuolización del neuropilo de una oveja afectada de Scrapie

Un estudio realizado al inicio de la epidemia de EEB en Reino Unido demuestra que mediante el examen histopatológico de una única sección de la médula oblongada a nivel del obex (Figs. 2 A y 2B), valorando el núcleo del tracto solitario y el núcleo del tracto espinal del nervio trigémino, se pueden detectar el 99,6% de los casos que presentan lesiones (Wells *et al.*, 1989). En el Scrapie ovino la vacuolización es más

destacada en la médula espinal, tronco del encéfalo y tálamo pero, a diferencia de la EEB, existe una gran variación en la distribución topográfica de las lesiones entre los individuos (Detwiler, 1992; Wood *et al.*, 1997; OIE, 2008). La vacuolización puede afectar a la sustancia gris de diversas áreas del encéfalo, observándose en un alto porcentaje de los casos en la corteza cerebral y cerebelar (Wood *et al.*, 1997). Entre los factores que pueden influir en el perfil lesional se han descrito: la cepa del agente causal del Scrapie, el genotipo del gen *PRNP*, la vía de infección, la edad del hospedador en el momento de la infección y la duración de la fase clínica (Begara-McGorum *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2002). A pesar de la variabilidad existente, el área que con mayor frecuencia e intensidad está afectada es la médula oblongada al nivel del obex, siendo generalmente el núcleo dorsal del nervio vago la primera localización de la vacuolización. Otras localizaciones que frecuentemente se encuentran afectadas en las primeras fases de la enfermedad son el núcleo del tracto solitario, el rafe medio, el núcleo del tracto espinal del nervio trigémino y el núcleo de la oliva (Begara-McGorum *et al.*, 2000; Hamir *et al.*, 2001).



Fig. 2 A Extracción del tronco del encéfalo. Ovino afectado de Scrapie



Fig. 2 B: Médula oblongada en el tronco del encéfalo (punta del bisturí). Ovino afectado de Scrapie.

En el Scrapie atípico no se observa vacuolización en la médula oblongada al nivel del obex, siendo las áreas más afectadas la corteza cerebelar y cerebral y, en menor medida, el mesencéfalo. Este perfil lesional atípico se acompaña de una distribución de la PrP^{sc} y un patrón de glicosilación diferente a otros casos de Scrapie, se presenta en ovejas con al menos un haplotipo AHQ y se ha asociado a una nueva cepa de Scrapie, posiblemente de origen espontáneo (Benestad *et al.*, 2003; Lühken *et al.*, 2007).

A pesar de la uniformidad en el perfil lesional presente en la EEB y en menor medida en el Scrapie, el examen histopatológico del encéfalo no garantiza la confirmación del diagnóstico de todos los casos clínicos de estas enfermedades. Las lesiones

nes vacuolares varían en intensidad y en determinados casos pueden ser mínimas o insuficientes para confirmar el diagnóstico, dando lugar a resultados no concluyentes (Wells *et al.*, 1989; Begara-McGorum *et al.*, 2000).

Por otro lado, una vacuolización del tejido nervioso puede ser atribuido a otras causas. Así, en bovinos con signos neurológicos, y también en animales sanos, se ha observado una vacuolización del pericarion neuronal en diversas regiones neuroanatómicas cuya causa se desconoce; se presenta frecuentemente en el núcleo rojo y en el núcleo habenuar y ocasionalmente en otras áreas como la formación reticular, la sustancia gris intermedia de la médula espinal, el núcleo parasimpático y el núcleo motor del nervio facial, el núcleo motor del nervio oculomotor, el núcleo gracilis y el núcleo cuneado lateral (McGill y Wells, 1993; Gavier-Widen *et al.*, 2001). En el caso del ovino también se puede detectar vacuolización en neuronas y en el neuropilo en diferentes localizaciones en animales no afectados por una EET, entre las que se encuentra el núcleo dorsal del nervio vago (Schreuder *et al.*, 1997; OIE, 2008). Asimismo, diversas causas debidas a la toma o procesado defectuosos de la muestra pueden producir artefactos que se asemejan a las lesiones producidas por una EET (Wells *et al.*, 1989; Wells y Wells, 1989; Jeffrey, 1992).

Finalmente, destacar que el término encefalopatía espogiforme es un término descriptivo que en neuropatología alude a cualquier enfermedad en la que la espongirosis o vacuolización es la lesión predominante (Wells, 2003). La espongirosis puede afectar tanto a la sustancia gris como a la blanca, siendo las enfermedades priónicas el principal ejemplo de enfermedades que cursan con vacuolización de la sustancia gris. La necrosis cerebrocortical o la intoxicación por plomo produce una espongirosis laminar en el neuropilo de la corteza cerebral (Summers *et al.*, 1995). La espongirosis de la sustancia blanca es característica de diversas alteraciones tóxicas y metabólicas, como la encefalopatía hepática o la encefalopatía renal (McGill y Wells, 1993).

Respecto a la gliosis, consiste en una respuesta común e inespecífica de las células de la glía frente a diferentes estímulos y que también está presente frecuentemente en las enfermedades priónicas (Summers *et al.*, 1995). En este grupo de enfermedades puede observarse una astrogliosis hipertrófica y una activación de la microglía, generalmente asociadas a los depósitos de PrP^{sc}, la vacuolización y la degeneración neuronal (Wells *et al.*, 1991; Lazarini *et al.*, 1994; Rezaie y Lantos, 2001; Titeux *et al.*, 2002). Los astrocitos como la microglía pueden acumular PrP^{sc} tanto en casos naturales como experimentales de EET (Ye *et al.*, 1998; Andréoletti *et al.*, 2002).

Otra lesión característica de las EET es la degeneración y pérdida neuronal, estudiada principalmente en animales de experimentación inoculados con el agente causal. En casos de infección natural de EEB y Scrapie se han observado además de la vacuolización, otras formas de degeneración neuronal como neuronas necróticas diseminadas acompañadas en ocasiones por neuronofagia, neuritas distróficas y neuronas contraídas y basofílicas (Wells y Wilesmith, 1995; Wood *et al.*, 1997). En la EEB se observa un despoblamiento neuronal en determinados núcleos del sistema nervioso central, llegando a producirse una reducción de hasta el 50% de las neuronas en los núcleos vestibulares (Jeffrey *et al.*, 1992; Jeffrey y Halliday, 1994) y en el núcleo de la oliva (Breslin *et al.*, 2003). Entre los núcleos en los que no se ha detectado una pérdida significativa de neuronas se encuentran el dorsal del nervio vago, el hipogloso, el caudado y el rojo (Jeffrey y Halliday, 1994; Breslin *et al.*, 2003). En el Scrapie se han detectado alteraciones intensas, con una apariencia laminar, en las neuronas piramidales de la lámina V de la corteza cerebral frontal (Wood *et al.*, 1997).

En diversas EET humanas y animales se ha observado la presencia de placas densas de amiloide en el sistema nervioso central coincidentes con un inmunomarcaje frente a la PrP^{sc} (McBride *et al.*, 1988; Wells *et al.*, 1991; Wells y McGill, 1992; Jeffrey *et al.*, 1998; Glatzel y Aguzzi, 2001). Estas placas son abundantes en determinadas EET humanas. Concretamente en el kuru, las denominadas placas de “tipo kuru” pueden observarse junto con finas espículas radiales, mientras que en la v-ECJ reciben el nombre de placas floridas al encontrarse rodeadas de vacuolas (Ferrer, 2002). La amiloidosis cerebral es también frecuente en el Scrapie ovino y, en menor medida, en el caprino. Se localiza en el cerebelo y en áreas rostrales del encéfalo, principalmente en la corteza cerebral. Se presentan como placas generalmente con forma estrellada, rodeadas por áreas de vacuolización del neuropilo y una marcada astrocitosis; también son frecuentes las placas con disposición perivascular (Wood y Done, 1992; Wood *et al.*, 1997; Jeffrey *et al.*, 1998). La presencia de este tipo de placas en la EEB es muy escasa (Wells y Wilesmith, 1995).

Por otro lado, puesto que una característica común y específica de las EET es la acumulación en el sistema nervioso central de la proteína PrP^{sc} (Fig. 3), éste se considera el único marcador molecular identificado asociado a estas enfermedades (Prusiner, 1998). La acumulación de PrP^{sc} en el tejido nervioso es previa a la neurodegeneración esponjiforme (DeArmond y Prusiner, 1993; Wells *et al.*, 1998; Jeffrey *et al.*, 2001), por lo que la utilización de métodos sensibles de detección de la PrP^{sc} permite el diagnóstico de los animales infectados en los que las lesiones son mínimas o no están presentes. Además, dada la alta resistencia de los priones a la degradación y

a diversos agentes fisicoquímicos (Taylor, 2000), estas técnicas se pueden aplicar en tejidos autolíticos o congelados en los que la falta de integridad del tejido impide el diagnóstico histopatológico.



Fig. 3: Acúmulos de PrP en el tejido nervioso de la médula oblongada. Vaca afectada de EEB

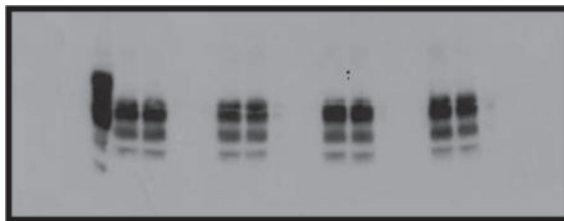


Fig. 4: Bandas específicas de PrP^{sc} en una muestra de la médula oblongada de una vaca afectada de EEB.

La mayoría de los métodos de diagnóstico actuales se basan en la detección del fragmento resistente a la proteinasa K (PrPres) de la PrP^{sc} mediante el uso de anticuerpos específicos. Los anticuerpos que se utilizan en el diagnóstico de las EET no discriminan entre ambas isoformas de la proteína, por lo que previamente a la detección de la PrPres es necesario degradar la PrP^c, generalmente con proteinasa K (PK).

La inmunohistoquímica detecta la PrP^{sc} *in situ*, lo que permite determinar tanto la presencia de la PrP^{sc} como su distribución en el tejido, su localización celular y las características morfológicas de la acumulación (González *et al.*, 2003). Diversos trabajos demuestran la capacidad de la inmunohistoquímica para detectar la PrP^{sc} en tejidos en los que no es posible realizar un diagnóstico histopatológico ya que han perdido su morfología por la autólisis o por la congelación (Miller *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1996; Monleón *et al.*, 2003). Los depósitos de PrP^{sc} pueden observarse tanto asociados a las lesiones histopatológicas como en áreas donde no se presenta vacuolización o ésta es mínima (Foster *et al.*, 1996; Hardt *et al.*, 2000). La inmunotinción suele ser bilateral (Ryder *et al.*, 2001) y se localiza principalmente en el tronco del encéfalo, aunque en el caso del Scrapie con frecuencia se distribuye por todo el sistema nervioso central (Haritani *et al.*, 1994; González *et al.*, 2003).

El diagnóstico de las EET por inmunohistoquímica debe realizarse mediante la identificación del patrón característico de inmunotinción, a través de su distribución topográfica y una localización celular específica (Wells y Wilesmith 1995; Ryder *et al.*,

2001). Los diferentes tipos de inmunotinción específicos del depósito de PrP^{sc} en el Scrapie (Miller *et al.*, 1993; O'Rourke *et al.*, 1998; Hardt *et al.*, 2000; Ryder *et al.*, 2001) han sido descritos detalladamente por González *et al.* (2002; 2003).

La especificidad y sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica depende en gran medida de la metodología y los anticuerpos utilizados (Haritani *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1997; Hardt *et al.*, 2000; Monleón *et al.*, 2004). Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos utilizados para la detección de la PrP^{sc} reconocen las dos isoformas de la proteína prión y tanto el proceso de fijación como la acumulación y formación de agregados de la PrP^{sc} ocultan los epítomos necesarios para la reacción con el anticuerpo. Ello implica la necesidad de utilizar una metodología que permita la supresión de la PrP^c, así como una recuperación e incremento de la exposición de los epítomos ocultos de la PrP^{sc} (Hardt *et al.*, 2000). Para ello, diversos pre-tratamientos han sido aplicados previamente a la inmunotinción para desenmascarar epítomos, potenciando la inmunotinción específica y minimizando la inespecífica.

Al contrario que en la EEB, en el Scrapie se produce una amplia distribución de la PrP^{sc} en el organismo, principalmente en el sistema linforreticular (Jeffrey y Gonzalez, 2007). En la actualidad, la demostración de la presencia de la PrP^{sc} en el tejido linfoide está utilizándose cada vez más para el diagnóstico del Scrapie tanto *in vivo* como *post mortem* (Schreuder *et al.*, 1998; O'Rourke *et al.*, 2002; Monleón *et al.*, 2005; Langeveld *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008). La aplicación de técnicas inmunohistoquímicas sobre muestras de tejido linfoide obtenido mediante biopsia, principalmente de tonsilas palatinas (Schreuder *et al.*, 1998), tercer párpado (O'Rourke *et al.*, 2002) y mucosa rectal (González *et al.*, 2005; Espenes *et al.*, 2006) permite diagnosticar la enfermedad incluso en fases preclínicas de la misma. En animales con genotipos susceptibles se ha descrito una sensibilidad del test realizado en biopsia de tejido linfoide asociado al tercer párpado y a la mucosa rectal del 85-90% (O'Rourke *et al.*, 2002; Dennis *et al.*, 2009). Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones, debido a que algunos animales únicamente presentan depósitos de PrP^{sc} en el sistema nervioso central.

La técnica de *Western blot* para la detección de la PrP^{sc} es un método de diagnóstico de las EET de una alta sensibilidad con el que se obtienen resultados cualitativos que permiten confirmar la especificidad de la señal (Deslys *et al.*, 2001). Puesto que como se ha mencionado anteriormente, tanto la PrP^c como la PrP^{sc} tienen un peso molecular (Pm) de 33 - 35 kDa (Meyer *et al.*, 1986; Prusiner, 1998), si ambas proteínas se someten a un proceso de digestión con PK, la PrP^c se degrada completamente mientras que en la PrP^{sc} se elimina el extremo N-terminal quedando una fracción de la misma resistente a la PK de un Pm de 27 - 30 kD, denominada PrP 27 - 30 o PrPres (Oesch *et al.*, 1985).

La técnica de *Western blot* permite la detección del fragmento PrPres de la PrP^{sc} mediante la reacción específica con anticuerpos (Fig. 4). La metodología básica consiste en la extracción del fragmento resistente de la PrP^{sc} mediante una digestión con PK, la separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida mediante una electroforesis y su transferencia a una membrana de nitrocelulosa. En este protocolo general, la OIE recomienda incluir una extracción con detergentes (N-laurilsarcosina) y varios pasos de ultracentrifugación, lo que permite obtener una mayor concentración de proteína y por lo tanto, una mayor sensibilidad de la técnica (Bradley, 1994). La sensibilidad de esta técnica depende también de otros factores como el proceso de extracción o los anticuerpos utilizados (Madec *et al.*, 1998).

La detección de la PrPres mediante la técnica de *Western blot* se utiliza frecuentemente en el diagnóstico de la EEB y del Scrapie, especialmente para confirmar aquellos casos en los que las lesiones neuropatológicas son mínimas o no están presentes o el tejido no es adecuado para el examen histopatológico por autólisis, congelación o destrucción de las áreas de localización de las lesiones (Mohri *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 1992; Race *et al.*, 1994; Cooley *et al.*, 1999; Madec *et al.*, 2000; Manousis *et al.*, 2000). La detección de la PrPres en animales preclínicos que no presentan lesiones en el sistema nervioso central indica una mayor sensibilidad de la técnica respecto al examen histopatológico (Race *et al.*, 1992; Hamir *et al.*, 2001). También se ha demostrado una mayor sensibilidad de la técnica de *Western blot* con respecto a la demostración de las SAF (*Scrapie associated fibrils*; Cooley *et al.*, 1998). Además, en animales afectados por EEB se han detectado depósitos de PrPres en áreas del sistema nervioso central donde las lesiones histopatológicas no suelen presentarse, como en el cerebelo o la corteza cerebral, aunque las señales más intensas se obtienen en la médula oblongada y el mesencéfalo (Katz *et al.*, 1992; Madec *et al.*, 2000).

Las fibrillas asociadas a Scrapie (SAF), observables mediante microscopía electrónica, son marcadores ultraestructurales específicos de las EET (Stack *et al.*, 1997) cuyo constituyente principal es la PrP^{sc} (Hope *et al.*, 1988). Se observaron inicialmente en ratones y hámsters infectados experimentalmente con el agente causal del Scrapie (Merz *et al.*, 1981), y más tarde en el Scrapie ovino (Stack *et al.*, 1993) y caprino (Perrin *et al.*, 1991). Su detección en los primeros casos de EEB en Reino Unido constituyó una evidencia adicional al cuadro clínico y lesional para incluir a esta nueva enfermedad dentro del grupo de las EET (Wells *et al.*, 1987).

Estas fibrillas se pueden observar mediante microscopía electrónica utilizando técnicas de tinción negativa en fracciones subcelulares de tejido nervioso de animales afectados por la EEB y el Scrapie y se pueden identificar por su morfología

característica. La metodología consiste básicamente en el tratamiento de fracciones subcelulares del tejido nervioso con detergentes que solubilizan la PrP mientras que la PrP^{sc} se agrega en forma de varillas o fibrillas que posteriormente se pueden separar mediante ultracentrifugación y visualizar en el microscopio electrónico (Meyer *et al.*, 1986; Stack *et al.*, 1993).

Las SAF miden entre 100 - 500 nm de longitud, presentan una disposición lineal y están compuestas de 2 ó 4 filamentos de 4 - 6 nm de ancho. En función de su morfología se pueden identificar principalmente dos tipos, tipo I y II, aunque también se han observado fibrillas que tienen propiedades de ambos tipos (Merz *et al.*, 1981).

La alta especificidad de la técnica y su eficacia en tejidos autolíticos o congelados (Scott *et al.*, 1992; Stack *et al.*, 1993; Wells *et al.*, 1994), dio lugar a que se utilizara en el diagnóstico del Scrapie y la EBB como un criterio de diagnóstico independiente y de apoyo a las técnicas histopatológicas en el programa de vigilancia de estas enfermedades en Reino Unido (Wells y Wilesmith, 1995; Stack *et al.*, 1996).

REFERENCIAS

- Acín C, Martín-Burriel I, Goldmann W, Lyahyai J, Monzón M, Bolea R, Smith A, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol.* 2004a; 85: 2.103-2.110.
- Acín C, Martín-Burriel I, Monleón E, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P. PrP polymorphisms in Spanish sheep affected with natural scrapie. *Vet Rec.* 2004b; 155: 370-372.
- Aguzzi A. Peripheral prion pursuit. *J Clin Invest.* 2001; 108(5): 661-662.
- Aguzzi A. Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics and pathogenesis. *J Neurochem.* 2006; 97(6): 1.726-1.739.
- Aguzzi A, Heikenwalder M. Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4(10): 765-775.
- Aguzzi, A., Baumann, F., Bremer, J. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31: 439-477.
- Aiken J M, Williamson J L, Marsh R F. Evidence of mitochondrial involvement in scrapie infection. *J Virol* 1989; 63(4): 1686-94.
- Alverson J, O'Rourke KI, Baszler TV. PrP^{sc} accumulation in fetal cotyledons of scrapie-resistant lambs is influenced by fetus location in the uterus. *J Gen Virol.* 2006; 87: 1.035-1.041.
- Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, Van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol.* 2000; 81: 3.115-3.126.
- Andreoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, Berthon P, Eychenne F, Lafond-Benestad S, Elsen JM, Schelcher F. PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP gene type and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 10): 2.607-2.616.
- Andréoletti O, Berthon P, Levavasseur E, Marc D, Lantier F, Monks E, Essen JM, Schelcher F. Phenotyping of protein-prion (PrP^{sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-

- affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(10): 1357-70.
- Alper T, Cramp W A, Haig D A, Clarke M C. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214(5090): 764-6. 1967.
- Baldauf E, Beekes M, Diringer H. Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol.* 1997; 78(Pt 5): 1.187-1.197.
- Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA. Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J Virol.* 2003; 77(1): 583-591.
- Beekes M, McBride PA, Baldauf E. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol.* 1998; 79(Pt 3): 601-607.
- Beekes M, McBride PA. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett.* 2000; 278(3): 181-184.
- Begara-McGorum I, Clark AM, Martin S, Jeffrey M. Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec.* 2000; 147(16): 439-41.
- Begara-McGorum I, González L, Simmons M, Hunter N, Houston F, Jeffrey M. Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol.* 2002; 127(1): 59-68.
- Bell JE, Gentleman SM, Ironside JW, McCardle L, Lantos PL, Doey L, Lowe J, Fergusson J, Luthert P, McQuaid S, Allen IV. Prion protein immunocytochemistry - UK five centre consensus report. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 23(1): 26-35. 1997.
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 2003; 153(7): 202-8.
- Beringue, V., Vilotte, J.L. and Laude, H. Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res.* 2008; 39: 47-77.
- Borchelt D R, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner S B. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 1990; 110(3): 743-752.
- Bossers A, Belt PBGM, Raymond GJ, Caughey B, De Vries R, Smits MA. Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease resistant forms. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1997; 94: 4.931-4.936.
- Bradley R. Protocols for the laboratory diagnosis and confirmation of BSE and Scrapie. Comisión Europea. Directorate General for Agriculture. Unit for Veterinary Legislation and Zootechnics. 1994.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., Aguzzi, A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature.* 1996; 379: 339-343.
- Breslin PD, Bassett HF, Mc Elroy M, Markey B. A study of cell population changes, prion protein deposition and vacuolation in the olivary nuclear complex, the dorsal vagal nucleus and the hypoglossal nucleus in BSE-affected cattle. 21st Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Dublin. Pág 109. 2003.
- Brown, D.R. Copper and prion disease. *Brain Res Bull.* 2001; 55: 165-173.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguët, M., Weissmann, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* 1993; 73: 1339-1347.
- Buschmann A, Groschup MH. Highly bovine spongiform encephalopathy- sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis.* 2005; 192(5): 934-942.
- Campbell, A., Smith, M.A., Sayre, L.M., Bondy, S.C., Perry, G. Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2001; 55: 125-132.

- Caughey, B. Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem Sci.* 2001; 26:235-242.
- Cazaubon, S., Viegas, P. and Couraud, P.O. Functions of prion protein PrP^C. *Med. Sci.* , 2007; 23:741-745.
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith J M, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 1985; 315: 331-333.
- Come, J.H., Fraser, P.E., Lansbury, P.T., Jr. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 5959-5963.
- Cooley WA, Clark JK, Stack MJ. Comparison of scrapie-associated fibril detection and Western immunoblotting for the diagnosis of natural ovine scrapie. *J Comp Pathol.* 1998; 118(1): 41-9.
- Cooley WA, Davis LA, Keyes P, Stack MJ. The reproducibility of scrapie-associated fibril and PrP^{Sc} detection methods after long-term cold storage of natural ovine scrapie-affected brain tissue. *J Comp Pathol.* 1999; 120(4): 357-68.
- Curnow RN, Hau CM. The incidence of bovine spongiform encephalopathy in the progeny of affected sires and dams. *Vet Rec.* 1996; 138(17): 407-408.
- Danner, K. BSE--a risk for man through pharmaceutical products? Position and politics of the German pharmaceutical industry. *Dev Biol Stand.* 1993. 80:199-205.
- Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Vet Rec.* 1998; 142: 623-625.
- DeArmond SJ, Prusiner SB. The neurochemistry of prion diseases. *J Neurochem.* 1993; 61(5): 1589-601.
- Dennis MM, Thomsen BV, Marshall KL, Hall SM, Wagner BA, Salman MD, Norden DK, Gaiser C, Sutton DL. Evaluation of immunohistochemical detection of prion protein in rectoanal mucosa-associated lymphoid tissue for diagnosis of scrapie in sheep. *Am J Vet Res.* 2009; 70(1): 63-72.
- Deslys JP, Lasmezas CI, Comoy E, Domont D. Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J.* 2001; 161(1): 1-3.
- Detwiler LA. Scrapie. *Rev Sci Tech.* 1992; 11(2): 491-537.
- Detwiler LA, Baylis M. The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech.* 2003; 22(1): 121-143.
- Dickinson AG, Outram GW. Genetic aspects of unconventional virus infections: The basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp* 1988; 135: 63-83.
- Donnelly CA. Statistical aspects of BSE and vCJD: models for epidemics. *Monographs on Statistics and Applied Probability n. 84.* Londres-Nueva York-Washington DC: Chapman and Hall-CRC Boca Raton 84, 1999.
- Ersdal C, Ulvund MJ, Espenes A, Benestad SL, Sarradin P, Landsverk T. Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol.* 2005; 42(3): 258-274.
- Espenes A, Press CM, Landsverk T, Tranulis MA, Aleksandersen M, Gunnes G, Benestad SL, Fuglesteit R, Ulvund MJ. Detection of PrP(Sc) in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J Comp Pathol.* 2006; 134(2-3): 115-25.
- Evoniuk, J.M., Johnson, M.L., Borowicz, P.P., Caton, J.S., Vonnahme, K.A., Reynolds, L.P., Taylor, J.B., Stoltzenow, C.L., O'Rourke, K.I., Redmer, D.A. Effects of nutrition and genotype on prion protein (PrP^C) gene expression in the fetal and maternal sheep placenta. *Placenta.* 2008; 29: 422-428.
- Ferrer I. Neuropatología de las encefalopatías espongiformes transmisibles en el ser humano. *Med Clin (Barc).* 2002; 119(1): 44-51.
- Flechsigs, E. and Weissmann, C. The role of PrP in health and disease. *Curr Mol Med.* 2004; 4: 337-353.
- Foster JD, Wilson M, Hunter N. Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec.* 1996; 139(21): 512-5.

- Gavier-Widen D, Wells GA, Simmons MM, Wilesmith JW, Ryan J. Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *J Comp Pathol.* 2001; 124(1): 52-9.
- Gavier-Widén D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17(6): 509-27.
- Glatzel M, Aguzzi A. Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect.* 2000; 2(6): 613-619.
- Glatzel M, Aguzzi A. The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001 ; 36(2-3): 241-8.
- Glockshuber R, Hornemann S, Reik R, Billeter M, Wider G, Liemann S, et al. Folding and three-dimensional NMR structure of the recombinant cellular prion protein from the mouse. En: Harris DA, ed. *Prions: molecular and cellular biology.* Wymondham: Horizon Scientific Press, 1999; 1-25.
- Goldmann W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res.* 2008; 39: 30.
- Goldman W, Hunter N, Multhaup G, Salbalm J, Foster D, Beyreuther K, Hope J. The PrP gene in natural scrapie. *Alzheimer Dis Assoc Disorders* 1988; 330.
- Goldmann W, Hunter N, Foster J, Salbaum JM, Beyreuther K, Hope J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 2.476-2.480.
- González L, Martin S, Begara-McGorum I, Hunter N, Houston F, Simmons M, Jeffrey M. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol.* 2002; 126(1):17-29.
- González L, Martin S, Jeffrey M. Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol.* 2003; 84(Pt 5): 1339-1350.
- González L, Jeffrey M, Sisó S, Martin S, Bellworthy SJ, Stack MJ, Chaplin MJ, Davis L, Dagleish MP, Reid HW. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *Vet Rec.* 2005; 156(26): 846-847.
- González L, Dagleish MP, Martin S, Dexter G, Steele P, Finlayson J, Jeffrey M. Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet Rec.* 2008; 162(13): 397-403.
- Griffith J S. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967; 215(5105): 1043-1044.
- Haase B, Doherr M, Seuberlich T, Drögemüller C, Dolf G, Nicken P, **Schiebel K., Ziegler U., Groschup MH., Zurbriggen A., Leeb T.** PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genetics.* 2007; 8: 15-22.
- Hadlow, W.J., Kennedy, R.C., Race, R.E. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis.* 1982; 146: 657-664.
- Hamir AN, Miller JM, Schmerr MJ, Stack MJ, Chaplin MJ, Cutlip RC. Diagnosis of preclinical and subclinical scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing currently available *post-mortem* diagnostic techniques. *J Vet Diagn Invest.* 2001; 13(2): 152-154.
- Hardt M, Baron T, Groschup MH. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol.* 2000; 122(1): 43-53.
- Haritani M, Spencer YI, Wells GA. Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol.* 1994; 87(1): 86-90.
- Heggebo R, González L, Press CM, Gunnes G, Espenes A, Jeffrey M. Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol.* 2003; 84(Pt 5): 1.327-1.338.
- Heaton MP, Leymaster KA, Freking BA, Hawk DA, Smith TP, Keele JW, Snelling WM., Fox IM., Chitko-McKown CG., Laegreid WW. Prion gene sequence variation within diverse groups of US sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome.* 2003; 14: 765-777.

- Herrmann, L.M., Baszler, T.V., Knowles, D.P. PrP(c) mRNA, but not PrP(Sc) is found in the salivary glands of scrapie-infected sheep. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1479: 147-154.
- Hill AF, Collinge J. Subclinical prion infection. *Trends Microbiol*. 2003; 11(12): 578-584.
- Hoinville LJ. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*. 1996; 15(3): 827- 852.
- Hope J, Reekie LJ, Hunter N, Multhaup G, Beyreuther K, White H, Scott AC, Stack MJ, Dawson M, Wells GA. Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature* 1988; 336(6197): 390-392.
- Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M. A cellular form of prion protein (PrP^c) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol*. 1995; 76: 2583-2587.
- Hunter N. PrP genetics in sheep and the application for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*. 1997; 5: 331-334.
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C., Houston F. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*. 2002; 83(Pt 11): 2.897-2.905.
- Jeffrey M. A neuropathological survey of brains submitted under the Bovine Spongiform Encephalopathy Orders in Scotland. *Vet Rec*. 1992; 131(15): 332-337.
- Jeffrey M, Halliday WG, Goodsir CM. A morphometric and immunohistochemical study of the vestibular nuclear complex in bovine spongiform encephalopathy. *Acta Neuropathol* 1992; 84(6): 651-657.
- Jeffrey M, Halliday WG. Numbers of neurons in vacuolated and non-vacuolated neuroanatomical nuclei in bovine spongiform encephalopathy-affected brains. *J Comp Pathol*. 1994; 110(3): 287-293.
- Jeffrey M, Goodsir CM, Holliman A, Higgins RJ, Bruce ME, McBride PA, Fraser JR. Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec*. 1998; 142(20): 534-537.
- Jeffrey M, Martin S, Thomson JR, Dingwall WS, Begara-McGorum I, González L. Onset and distribution of tissue PrP accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol*. 2001; 125(1): 48-57.
- Jeffrey M, Martin S, Barr J, Chong A, Fraser JR. Onset of accumulation of PrPres in murine ME7 scrapie in relation to pathological and PrP immunohistochemical changes. *J Comp Pathol*. 2001; 124(1): 20-28.
- Jeffrey M, Begara-McGorum I, Clark S, Martin S, Clark J, Chaplin M, Gonzalez L. Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol*. 2002; 127(4): 264-273.
- Jeffrey M, González L. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007; 33(4): 373-394.
- Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, Fries RA. Major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biology*. 2006; 4: 33.
- Katz JB, Pedersen JC, Jenny AL, Taylor WD. Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet 1992; Diagn Invest*. 4(4): 447-9.
- Kimberlin RH. An assessment of genetical methods in the control of scrapie. *Livest Prod Sci*. 1979; 6: 233-242.
- Kimberlin RH, Walker CA. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol*. 1980; 51(Pt 1): 183-187.
- Klein MA, Frigg R, Flechsigs E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel R M, Aguzzi A. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*. 1997; 390: 687-690.

- Kovacs, G.G., Budka, H. Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol* . 2008; 172: 555-565.
- Kretzschmar H A, Stowring L E, Westaway D, Stubblebine W H, Prusiner S B, Dearmond S J. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 1986; 5(4): 315-24.
- Lacroux C, Corbiere F, Tabouret G, Lugan S, Costes P, Mathey J, Delmas JM., Weisbecker JL., Foucras G., Cassard H., Elsen JM., Schelcher F., Andréoletti O. Dynamics and genetics of PrP^{Sc} placental accumulation in sheep. *J Gen Virol*. 2007; 88(Pt 3): 1.056-1.061.
- Langeveld JP, Jacobs JG, Erkens JH, Bossers A, Van Zijderveld FG, Van Keulen LJ. Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res*. 2006; 2: 19.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J., Dormont, D.. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, 1997; 275, 402-405.
- Lasmezas C I. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech*. 2003; 22(1): 23-36.
- Lawson, V.A., Collins, S.J., Masters, C.L. and Hill, A.F. Prion protein glycosylation. *J Neurochem*. 2005; 93:793-801
- Lazarini F, Boussin F, Deslys JP, Tardy M, Dormont D. Astrocyte gene expression in experimental mouse scrapie. *J Comp Pathol*. 1994; 111(1): 87-98.
- Liao Y C, Tokes Z, Lim E, Lackey A, Woo C H, Button J D, Clawson G A. Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. *Lab Invest* 1987; 57(4): 370-4.
- Ligios C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Simmons MM. Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol*. 2002; 127(1): 45-57.
- Ligios C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M, **Maestrale C., Cancedda MG., L., Madau, L., Aguzzi.A**, PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med*. 2005; 11(11): 1.137- 1.138.
- Locht C, Chesebro B, Race R, Keith J M. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(17): 6372-6376.
- Lowenstein D H, Butler D A, Westaway D, McKinley M P, DeArmond S J, Prusiner S B. Three hamster species with different scrapie incubation times and neuropathological features encode distinct prion proteins. *Mol Cell Biol* 1990; 10(3): 1153-63.
- Lühken G, Buschmann A, Brandt H, Eiden M, Groschup MH, Erhardt G. Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res*. 2007; 38(1): 65-80.
- Mabbott NA, Bruce ME. The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*. 2001; 82: 2.307-2.318.
- Madec JY, Groschup MH, Buschmann A, Belli P, Calavas D, Baron T. Sensitivity of the Western blot detection of prion protein PrPres in natural sheep scrapie. *J Virol Methods*. 1998; 75(2): 169-77.
- Madec JY, Belli P, Calavas D, Baron T. Efficiency of Western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France. *Vet Rec*. 2000 ; 146(3): 74-76.
- Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol*. 1999; 80: 3.035-3.042.
- Manuelidis L. A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem* 2007; 100(4): 897-915.
- Manousis T, Sachsamoglou M, Toumazos P, Verghese-Nikolaki S, Papadopoulos O, Sklaviadis T. Western blot detection of PrP(Sc) in Cyprus sheep with natural scrapie. *Vet J*. 2000; 159(3): 270-273.

- McBride PA, Bruce ME, Fraser H. Immunostaining of scrapie cerebral amyloid plaques with antisera raised to scrapie-associated fibrils (SAF). *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1988;14(4): 325-336.
- McGill IS, Wells GA. Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Comp Pathol.* 1993; 108(3): 241-60.
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.* 1981; 54(1): 63-74.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(8): 2310-2314.
- McKnight S, Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 1986; 46(6): 795-805.
- Miller JM, Jenny AL, Taylor WD, Marsh RF, Rubenstein R, Race RE. Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest.* 1993; 5(3): 309-316.
- Mohan J, Brown KL, Farquhar CF, Bruce ME, Mabbott NA. Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *J Dermatol Sci.* 2004; 35(2): 101-111.
- Mohri S, Farquhar CF, Somerville RA, Jeffrey M, Foster J, Hope J. Immunodetection of a disease specific PrP fraction in scrapie-affected sheep and BSE-affected cattle. *Vet Rec.* 1992; 131(23): 537-539.
- Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J., La Bonnardiére, C. Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol.* 2001; 82: 2017-2024.
- Monleón E, Monzón M, Hortells P, Vargas A, Badiola JJ. Detection of PrP(sc) in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51(1): 15-18.
- Monleón E, Monzón M, Hortells P, Vargas A, Acín C, Badiola JJ. Detection of PrP^{sc} on lymphoid tissues from naturally affected scrapie animals: comparison of three visualization systems. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52(2): 145-51.
- Monleón E, Monzón M, Hortells P, Bolea R, Acín C, Vargas F, Badiola JJ. Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *J Virol Methods.* 2005; 125(2): 165-71.
- Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Moum T, Benestad, SL. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol.* 2005; 86: 231-235.
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley M P, Kent S B, Aebersold R, Barry R A, Tempst P, Teplow D B, Hood L E, Prusiner SB, Weissmann A. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 1985; 40(4): 735-746.
- Organización Internacional de Epizootias. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 2008.
- O'Rourke KI, Baszler TV, Miller JM, Spraker TR, Sadler-Riggleman I, Knowles DP. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(6): 1750-1755.
- O'Rourke KI, Duncan JV, Logan JR, Anderson AK, Norden DK, Williams ES, Combs BA, Stobart RH, Moss GE, Sutton DL. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(5): 966-971.
- Pan K M, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick R J, Cohen F E, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23): 10962-10966.
- Perrin GG, Perrin GJ, Benoit C. Detection of scrapie-associated fibrils in scrapie in goats. *Vet Rec.* 1991; 129(19): 432.

- Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M, Heppner FL, et al. Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*. 425: 957-962.
- Prusiner S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216(4542): 136-144.
- Prusiner S B. Novel structure and genetics of prions causing neurodegeneration in humans and animals. *Biologicals* 1990; 18(4): 247-262.
- Prusiner, S.B. Molecular biology of prion diseases. *Science*. 1991; 252: 1515-1522.
- Prusiner S B. The prion diseases. *Brain Pathol* 1998; 8(3): 499-513.
- Prusiner S B. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13363-13383.
- Prusiner S B, Scott M R. Genetics of prions. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 139-175.
- Prusiner SB, Groth D, Serban A, Koehler R, Foster D, Torchia M, Burton D, Yang SL, DeArmond SJ. Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(22): 10608-10612.
- Prusiner S B, Scott M R, DeArmond S J, Cohen F E. Prion protein biology. *Cell* 1998; 93(3): 337-348.
- Race R, Ernst D, Jenny A, Taylor W, Sutton D, Caughey B. Diagnostic implications of detection of proteinase K-resistant protein in spleen, lymph nodes, and brain of sheep. *Am J Vet Res*. 1992; 53(6): 883-889.
- Race RE, Ernst D, Sutton D. Severe autolysis does not prevent scrapie diagnosis in sheep. *J Vet Diagn Invest*. 1994; 6(4): 486-489.
- Race R, Oldstone M, Chesebro B. Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*. 2000; 74(2): 828-833.
- Rezaie P, Lantos PL. Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001; 35(1): 55-72.
- Ryder SJ, Spencer YI, Bellerby PJ, March SA. Immunohistochemical detection of PrP in the *medulla oblongata* of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec*. 2001; 148(1): 7-13.
- Safar, J.W., H.; Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. Eight prion strains have PrP^{sc} molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4: 1157-1165.
- Schreuder BE, van Keulen LJ, Smits MA, Langeveld JP, Stegeman JA. Control of scrapie eventually possible? *Vet Q*. 1997; 19(3): 105-13.
- Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smiths MA. Tonsillar biopsy and PrP^{sc} detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec*. 1998;142(21): 564-8.
- Scott AC, Wells GA, Chaplin MJ, Dawson M. Bovine spongiform encephalopathy: detection of fibrils in the central nervous system is not affected by autolysis. *Res Vet Sci*. 1992; 52(3): 332-6.
- Seeger H, Heikenwalder M, Zeller N, Kranich J, Schwarz P, Gaspert A, Seifert B., Miele G., Aguzzi A. Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science*. 2005; 310(5.746): 324-326.
- Siso S, Jeffrey M, González L. Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2009; 35(3): 232-246.
- Stack MJ, Scott AC, Done SH, Dawson M. Scrapie associated fibril detection on decomposed and fixed ovine brain material. *Res Vet Sci*. 1993; 55(2): 173-8.
- Stack MJ, Aldrich AM, Kitching AD, Scott AC. Comparison of biochemical extraction techniques for the detection of scrapie-associated fibrils in the central nervous system of sheep naturally affected with scrapie. *J Comp Pathol*. 1996; 115(2): 175-84.
- St Rose SG, Hunter N, Matthews L, Foster JD, Chase-Topping ME, Kruuk LE, Shaw DJ., Rhind SM., Will RG, Woulhouse MEJ. Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis*. 2006; 6: 5.

- Steele, A.D., Emsley, J.G., Ozdinler, P.H., Lindquist, S., Macklis, J.D. Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 3416-3421.
- Summers BA, Cummings JF, Lahunta A. *Veterinary Neuropathology*. Eds. Summers BA, Cummings JF, Lahunta A. St Louis, Mosby. 1995.
- Taylor DM. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet J*. 2000; 159(1): 10-7.
- Titeux M, Galou M, Gomes FC, Dormont D, Neto VM, Paulin D. Differences in the activation of the GFAP gene promoter by prion and viral infections. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002; 109(1-2): 119-27.
- Tuo, W., Zhuang, D., Knowles, D.P., Cheevers, W.P., Sy, M.S., O'Rourke, K.I. Prp-c and Prp-Sc at the fetal-maternal interface. *J Biol Chem*. 2001; 276: 18229-18234.
- Tuo W, O'Rourke K, Zhuang D, Cheevers W, Spraker T. Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{sc} accumulation in placentomes of scrapie infected shhep. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(9): 6.310-6.315.
- Van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol*. 1999; 121(1): 55-63.
- Van Keulen LJ, Langeveld JP, Garssen GJ, Jacobs JG, Schreuder BE, Smits MA. Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy: a review. *Vet Q*. 2000; 22(4): 197-200. Van Keulen LJ, Vromans ME, Van Zijderveld FG. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*. 2002; 110(1): 23-32.
- Vargas F, Luján L, Bolea R, Monleón E, Martín-Burriel I, Fernández A, De Blas, I., Badiola JJ. Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*. 2006; 20(1): 187-193.
- Weber S, Dorman D C, Lash L H, Erikson K, Vrana K E, Aschner M. Effects of manganese (Mn) on the developing rat brain: oxidative-stress related endpoints. *Neurotoxicology* 2002; 23(2): 169-75.
- Weissmann C. A 'unified theory' of prion propagation. *Nature* 1991; 352(6337): 679-83.
- Weissmann, C., Fischer, M., Raeber, A., Bueler, H., Sailer, A., Shmerling, D., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A., 1998. The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech*. 1998; 17: 278-290.
- Wells GA. Pathogenesis of BSE. *Vet Res Commun*. 2003; 27 Suppl 1: 25-8.
- Wells GA, Wells M. Neuropil vacuolation in brain: a reproducible histological processing artefact. *J Comp Pathol*. 1989; 101(4): 355-62.
- Wells GA, Wilesmith JW. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol*. 1995; 5(1): 91-103.
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*. 1987; 121(18): 419-20.
- Wells GA, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgins RJ, David GP. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the *medulla oblongata*. *Vet Rec*. 1989; 125(21): 521-4.
- Wells GA, Wilesmith JW, McGill IS. Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective. *Brain Pathol*. 1991; 1(2): 69-78.
- Wells GA, McGill IS. Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*. 1992; 53(1): 1-10.
- Wells GA, Scott AC, Wilesmith JW, Simmons MM, Matthews D. Correlation between the results of a histopathological examination and the detection of abnormal brain fibrils in the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Res Vet Sci*. 1994; 56(3): 346-51.
- Wells GA, Sayers AR, Wilesmith JW. Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histologically unconfirmed, clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*. 1995; 136(9): 211-6.

- Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson G A, Prusiner S B. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14): 6418-22.
- Westergard, L., Christensen, H.M., Harris, D.A. The cellular prion protein (PrP^c): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1772: 629-644.
- Wilesmith JW, Wells GA, Ryan JB, Gavier-Widen D, Simmons MM. A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*. 1997; 141(10): 239-243.
- Wood JL, Done SH. Natural scrapie in goats: neuropathology. *Vet Rec*. 1992; 131(5): 93-6.
- Wood JL, McGill IS, Done SH, Bradley R. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*. 1997; 140(7): 167-74.
- Wrathall AE, Brown KFD, Sayers AR, Wells GAH, Simmons MM, Farrelly SSJ, et al. Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Veterinary Record*. 2002; 150: 365-378.
- Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM, Simmons HA. Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology*. 2008; 70(5): 725-745.
- Ye X, Scallet AC, Kascsak RJ, Carp RI. Astrocytosis and amyloid deposition in scrapie-infected hamsters. *Brain Res*. 1998; 809(2): 277-87.
- Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, Zampieri P, Gelati M, Fiorini M, et al. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*. 2003; 348(8): 711-719.
- Zeng F, Watt NT, Walmsley AR, Hooper NM. Tethering the N terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J Neurochem*. 2003; 84(3): 480-490.
- Zhang H, Kaneko K, Nguyen J T, Livshits T L, Baldwin M A, Cohen F E, James T L, Prusiner S B. Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein. *J Mol Biol* 1995; 250(4): 514-26.
- Zhang L, Li N, Fan B, Fang M, Xu W. PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim Genet*. 2004; 35: 457-461.