



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Detección de la proteína PrPsc en el tracto digestivo de ovinos afectados por scrapie

PrPsc detection in the gastrointestinal tract of sheep infected with scrapie

Autor/es

Ana Celaya Pi

Director/es

Cristina Acín Tresaco
José Luis Pitarch Moré

Facultad de Veterinaria

2016

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
AGENTE CAUSAL	6
TRANSMISIÓN Y PATOGENIA	6
FACTORES GENÉTICOS	10
DIAGNÓSTICO	11
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
METODOLOGÍA	15
MUESTRAS	15
MÉTODOS	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
LOCALIZACIÓN DE DEPÓSITOS DE PrP ^{Sc}	19
DIFERENCIAS ENTRE FOCOS	23
DISTRIBUCIÓN DE LA PrP ^{Sc} E IMPLICACIONES EN LA CADENA ALIMENTARIA	25
CONCLUSIONES	27
CONCLUSIONS	27
VALORACIÓN PERSONAL	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXO I: Procesado inmunohistoquímico para la detección de la PrP ^{Sc}	34

RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones que se caracterizan por provocar una degeneración progresiva de tipo espongiforme en el sistema nervioso central (SNC). Una de las EET más importantes es el scrapie, una enfermedad de distribución mundial que afecta de forma natural al ganado ovino y caprino. La principal vía de entrada del prion en el organismo es a través del tejido linfoide asociado a la mucosa del intestino tras ingestión de productos contaminados, de manera que antes de alcanzar el SNC, la PrP^{Sc} migra y se acumula en otros tejidos del organismo, principalmente en el sistema linforreticular y en el sistema nervioso periférico. El objetivo de este trabajo consiste en realizar un estudio inmunohistoquímico de los tejidos que forman parte del tracto digestivo de ovinos afectados por scrapie con el fin de detectar los puntos de acumulación de la PrP^{Sc}, y así describir la vía de migración que sigue el prion y valorar su repercusión en la definición de los materiales específicos de riesgo en la especie ovina. Para ello se han seleccionado 11 ovejas afectadas por scrapie de forma natural procedentes de tres focos de erradicación de la comunidad autónoma de Aragón. Los resultados obtenidos parecen confirmar que las placas de Peyer son el punto de entrada del agente, y sugieren que la PrP^{Sc} se disemina principalmente por el sistema nervioso entérico, pudiendo llegar a alcanzar todos los órganos del tracto gastrointestinal, excepto la lengua. Esto supone que si animales infectados son llevados a matadero para consumo, una gran cantidad de productos contaminados podrían llegar a la cadena alimentaria.

ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are a group of neurodegenerative diseases caused by prions characterized by a progressive spongiform degeneration in the central nervous system (CNS). Scrapie is one of the most important TSE, a disease of worldwide distribution that affects naturally sheep and goats. The main pathway followed by prions to enter in the organism is through the gut-associated lymphoid tissue after ingestion of contaminated products, so that before it reaches the CNS, PrP^{Sc} migrates and accumulates in other tissues of the body, mainly in the lymphoreticular system and the peripheral nervous system. The aim of this work is to perform an immunohistochemical study of tissues that form part of the gastrointestinal tract of sheep affected by scrapie in order to detect the points of accumulation of PrP^{Sc}, and thus describe the migration path that follows the prion and assess the impact on the definition of specified risk materials in sheep. 11 sheep affected naturally by scrapie from three outbreaks located in the region of Aragon were selected. The results seem to confirm that Peyer's patches are the entry point of the agent, and suggest that PrP^{Sc} spread mostly through the enteric nervous system, being able to reach all organs of the gastrointestinal tract, except the tongue. This fact means that if infected animals are taken to slaughter for consumption, a large amount of contaminated products could reach the food chain.

INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones que se caracterizan por provocar una degeneración progresiva de tipo espongiforme en el Sistema Nervioso Central (SNC) que termina irremediablemente con la muerte del individuo que las padece.

Los priones se caracterizan por ser agentes no convencionales, ya que carecen de ácido nucleico, de ahí su nombre: prion (*protein infectious only*). Es por eso que no producen ni reacción inflamatoria ni respuesta humoral asociada. Además, gracias a su conformación son muy resistentes a los métodos físicos y químicos de inactivación como las altas temperaturas, la luz ultravioleta o los tratamientos con formaldehído.

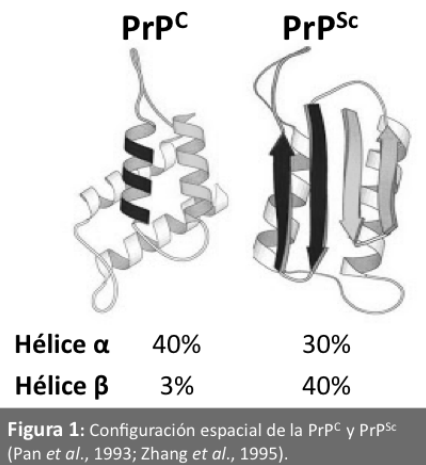
Se han descrito varias EET que afectan a diferentes especies: el *Scrapie* que afecta al ovino y caprino; la *Encefalopatía Espongiforme Bovina* (EEB); la *Enfermedad Crónica Caquetizante* (CWD) que afecta a ciervos y alces; la *Encefalopatía Transmisible del Visón* (ETV); la *Encefalopatía Espongiforme Felina* (EEF); y la *Encefalopatía de Ungulados Exóticos* (EUE). En el ser humano también se han descrito varias EET, aunque tienen una baja prevalencia: el *Kuru*, que fue descrito en poblaciones de Nueva Guinea en poblaciones de costumbres caníbales; el *Insomnio Familiar Fatal* (IFF); el *Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker*; la *Enfermedad de Creutzfeldt Jakob* (ECJ) que posee distintas variedades (hereditaria, esporádica y adquirida); y la *variante de ECJ* (vECJ). Esta última apareció como consecuencia del consumo de productos cárnicos procedentes de animales infectados de EEB, causando la mayor crisis alimentaria de la Unión Europea (Prusiner *et al.*, 1998).

En el caso concreto del scrapie, se trata de la EET más antigua de la que se tiene constancia, siendo descrita por primera vez en el Reino Unido a mediados del siglo XVIII. El scrapie afecta de forma natural al ganado ovino y caprino, y actualmente tiene una distribución prácticamente mundial. Es considerada como la enfermedad prototipo de las EET; de hecho, gracias a su estudio, en 1982 Prusiner propuso la hipótesis del prion como agente causal de este grupo de enfermedades. El interés por el scrapie se ha intensificado desde que se consideró como posible origen de la epidemia de EEB. Además, a pesar de que el scrapie no se considera zoonótico, recientes estudios no descartan esa posibilidad (Cassard *et al.*, 2014), por lo que es necesario seguir investigando al respecto.

AGENTE CAUSAL

El agente causal del scrapie es el prion, una proteína anómala (PrP^{Sc}) generada a partir de la conversión conformacional de una glicoproteína de superficie celular (PrP^C) presente de forma natural en el hospedador. La PrP^C se expresa en mayor medida en las células del sistema nervioso central (SNC), principalmente en neuronas y células de la glía, presentando también altos niveles de expresión en el sistema linforreticular (SLR), especialmente en linfocitos y células dendríticas foliculares.

La conversión de PrP^C en PrP^{Sc} implica un cambio en la conformación de la proteína: mientras que la PrP^C se caracteriza por poseer una estructura mayoritaria en hélice α ; la PrP^{Sc} está formada por una estructura en lámina plegada β en un 40% (Pan *et al.*, 1993) (Figura 1). Estudios comparativos de ambas proteínas han demostrado que este cambio de conformación supone grandes cambios en las propiedades de la proteína: la PrP^C es soluble en detergentes suaves no desnaturizantes y se digiere fácilmente con proteasas (proteínasa K), mientras que la PrP^{Sc} es insoluble en detergentes y además presenta una resistencia parcial frente a las proteasas, dando lugar a la isoforma PrP²⁷⁻³⁰, la cual tiene un tamaño de 27-30 kDa (Prusiner *et al.*, 1998).



Además, la PrP^{Sc} posee una serie de características que la hacen especial en comparación con otros agentes causales: a) tiempos de incubación muy largos; b) resistencia a las condiciones ambientales físicas como el calor (hasta 80°C) o las radiaciones ionizantes y la radiación ultravioleta, y también químicas, como desinfectantes (formaldehído); c) no induce ningún tipo de respuesta de tipo inflamatorio o inmune en el hospedador; d) carece de material genético.

TRANSMISIÓN Y PATOGENIA

La entrada más habitual del agente de forma natural es por vía oral (Wells y Willesmith, 1995), debido al contacto directo con excreciones de animales infectados que contaminan el ambiente del hospedador (Foster *et al.*, 1996; van Keulen *et al.*, 2002). Experimentalmente también se ha podido transmitir la enfermedad por las vías intracerebral, intraperitoneal, intravenosa, intraocular, conjuntival y por 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 mecanismos

patogénicos se producen en función de factores exógenos y endógenos como la cepa, la dosis, la vía de entrada y el genotipo del hospedador (Maignien *et al.*, 1999; Bruce, 2003; Grassi, 2003; Urtenberger, 2005).

Así pues, en el scrapie existe una transmisión horizontal directa por excreciones y secreciones (Hoinville, 1996; Ryder *et al.*, 2004; Wrathall *et al.* 2008); y otra indirecta ambiental, a través de la placenta (Andreoletti *et al.*, 2002; Tuo *et al.* 2010), heces (Maignien *et al.*, 1999) y carcasas de animales infectados (Miller *et al.*, 2004). En cuanto a la contaminación vertical pura, es decir *in utero*, no ha sido demostrada; aunque diversos autores consideran también transmisión materna a aquella producida por el estrecho contacto entre la madre, y sus secreciones y excreciones, y el cordero neonato, inmediatamente después del parto (Detwiller y Baylis, 2003).

En el caso de infección natural por vía oral, se ha descrito que el agente penetra en el organismo a través del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT, del inglés: *Gut Associated Lymphoid Tissue*), principalmente a nivel de íleon (Andreoletti *et al.*, 2000). Aquí es donde se encuentran las Placas de Peyer, las cuales involucionan con la edad, lo que podría explicar la mayor susceptibilidad en edades más tempranas (St Rose *et al.*, 2006).

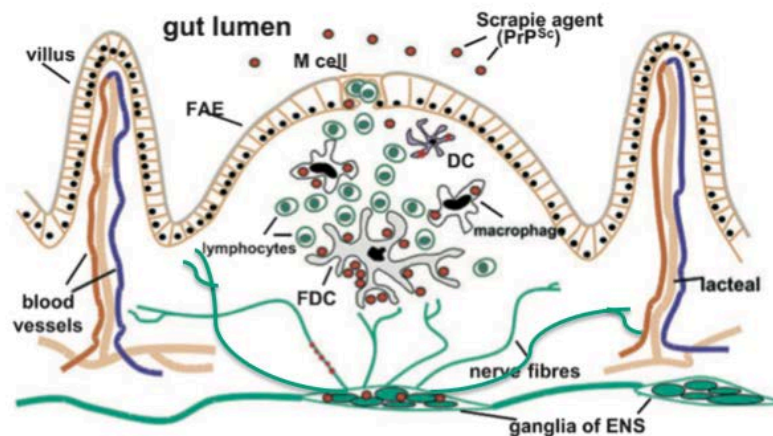


Figura 2: Esquema histológico de la captación de la PrP^{Sc} por las células M en la Placas de Peyer. Células y tejidos componentes del intestino, enseñando la deposición de PrP^{Sc}: células M (M cells), folículos asociados al epitelio (FAE), células dendríticas (DC), células dendríticas foliculares (FDC), fibras y ganglios del sistema nervioso entérico (ENS), vellosidades (villous) (Beekes *et al.*, 2009).

La entrada del prion al organismo (Figura 2) se produce por translocación en las células M, intercaladas entre los enterocitos adyacentes a la Placas de Peyer. Estas células son muy similares a los enterocitos, pero se caracterizan por captar proteínas sin degradarlas

posteriormente. Una vez que la célula M ha captado una proteína se la presenta a los Linfocitos B, alcanzando así el Sistema Linforreticular (SLR), donde comienza a replicarse en los macrófagos de cuerpo tingible y en las células dendríticas foliculares (Mabbot y Bruce, 2001). Además de las Placas de Peyer intestinales, las tonsilas palatinas también se consideran otro punto de entrada para la PrP^{Sc} intercalándose en el epitelio escamoso del paladar (Andreoletti *et al.*, 2000).

Existen dos rutas principales de llegada de la PrP^{Sc} al SNC: una directa, a través del sistema nervioso periférico (SNP); y una indirecta, a través del SLR y con posterior incorporación al SNP. Estas rutas se ven afectadas principalmente por tres factores: la cepa patógena, la especie del hospedador y la susceptibilidad genética de éste (Beekes y McBridge, 2000; Glatzel y Aguzzi, 2000; van Keulen *et al.* 2002; Heggebo *et al.*, 2003).

En el caso de la ruta directa, aunque todavía no se conozca con certeza el mecanismo exacto, diversos estudios sugieren que se produce a partir del paso de las células dendríticas a las células nerviosas que inervan los folículos linfoides (Bencksick *et al.* 2001a, Bencksick *et al.* 2001b, Heggebo *et al.*, 2003). Es así como desde el inicio del proceso se pueden observar acumulación de PrP^{Sc} en el plexo submucoso o de Meissner y en el mientérico o de Auerbach a nivel del

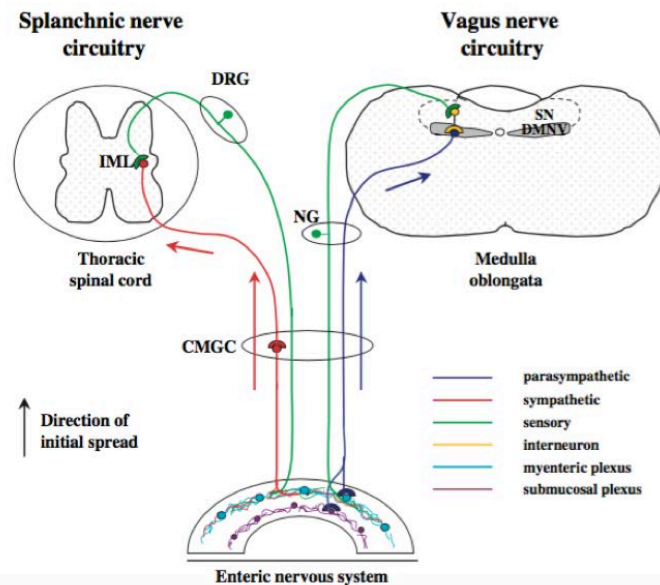


Figura 3: Rutas neuronales de distribución centripeta de los priones desde el intestino al cerebro y médula espinal tras la infección oral. (CMGC, Complejo Ganglio Mesentérico-Celiaco; DMNV, Núcleo Dorsal Mayor del N. Vago; DRG, Raíz Dorsal del Ganglio; IML, Columna Celular Intermediolateral; NG, Ganglio Nodoso; SN, Tracto Solitario) (Beekes *et al.*, 2009).

íleon y duodeno, e irá diseminándose por todo el sistema nervioso entérico (SNE) (van Keulen *et al.*, 1999; Andreoletti *et al.*, 2000; Jeffrey *et al.*, 2001; Heggebo *et al.*, 2003). Recientemente, un estudio realizado en el ganado caprino ha demostrado que tras el sacrificio secuencial de las cabras inoculadas oralmente, la PrP^{Sc} se acumula inicialmente en las placas de Peyer y los linfonodos mesentéricos del íleon y yeyuno, diseminándose posteriormente por los plexos nerviosos de los intestinos hasta alcanzar el SNC (Lacroux *et al.* 2014). Finalmente, el prion alcanza el SNC, concretamente el núcleo dorsal de la médula oblongata, a través de las fibras

nerviosas parasimpáticas eferentes del SNP (Beekes *et al.*, 1998; Race *et al.*, 2000; van Keulen *et al.*, 2002) (Figura 3).

En cuanto a la vía indirecta se produce tras el paso del prion al SLR (nódulos linfáticos, bazo y amígdalas) siguiendo por el SNP hasta acabar en el SNC (Figura 3). Esto se produce mediante la inervación simpática del bazo vía ganglionar hasta alcanzar la columna intermedio lateral de la médula espinal torácica (Beekes *et al.*, 1998; Race *et al.*, 2000; Keulen *et al.*, 2002). Según algunos autores, la replicación en el SLR no es indispensable (Aguzzi, 2001; Ersdal *et al.*, 2005).

Es importante destacar que existen posibles vías alternativas como la vía hematogena (Maignen *et al.*, 1999; Aguzzi y Heikenwalder, 2006). Esto se conoce por casos descritos recientemente de individuos que han adquirido la enfermedad por transfusiones sanguíneas contaminadas (Hunter *et al.*, 2002). Una de las hipótesis que se barajan para explicar la llegada del prion al encéfalo es la entrada por los órganos circunventriculares, áreas del encéfalo en las que la barrera hematoencefálica es inexistente (Sisó *et al.*, 2009).

Una vez alcanzado el SNC, el prion se disemina cráneo-ventralmente por el resto del encéfalo y de la médula espinal, acumulándose y produciendo astrogliosis, vacuolización del tejido nervioso y neurodegeneración. Todos estos procesos darán lugar a la sintomatología nerviosa característica de la enfermedad. Por último, decir que la PrP^{Sc} también puede diseminarse de forma centrífuga por el SNP, alcanzando y acumulándose en diversos tejidos y órganos. Según la bibliografía, se ha descrito PrP^{Sc} en los siguientes órganos: pulmón (Ryder *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2010), hígado (Everest *et al.*, 2011), riñón (Ligios *et al.*, 2007; Garza *et al.*, 2014), glándula adrenal (Garza *et al.*, 2014), vejiga (Garza *et al.*, 2014), páncreas (Garza *et al.*, 2014), piel (Garza *et al.*, 2014), músculo esquelético (Andreoletti *et al.*, 2004) glándula mamaria (Ligios *et al.*, 2005; Lacroux *et al.*, 2008) y glándulas salivares (Vascellari *et al.*, 2007). También se ha conseguido detectar en fluidos y excreciones como son la saliva (Vascerali *et al.*, 2007), la orina (Gregory *et al.*, 2008), las heces (Maluquer *et al.*, 2008; Safar *et al.*, 2009; Krüger *et al.*, 2009) y la leche (Ligios *et al.*, 2005).

En el caso concreto del tracto gastrointestinal, se han descrito depósitos de PrP^{Sc} en GALT, siendo las placas de Peyer el principal punto de entrada del prion en el organismo por infección natural, y también en las neuronas de los plexos entéricos, principalmente a nivel del

tubo intestinal (Andreoletti *et al.*, 2000). También se ha encontrado PrP^{Sc} en los estómagos, pero de forma poco constante y en poca cantidad (Jeffrey *et al.*, 2001; Van Keulen *et al.* 1999). Por último decir que un estudio de 1999 describe el papel que juega el genotipo del hospedador en la aparición y distribución de la PrP^{Sc} a lo largo del tracto gastrointestinal (Figura 4).

Figura 4: Susceptibilidad de los distintos genotipos a acumular la proteína priónica en el tracto digestivo (van Keulen *et al.*, 1999).

SUSCEPTIBILIDAD

+



VRQ/ VRQ: Desde los preestómagos hasta el recto terminal.

VRQ/ - (Heterocigoto): Desde los preestómagos hasta el recto terminal (NO en el esófago distal).

ARQ/ ARQ: Omaso, Abomaso, Intestino Delgado, Intestino Grueso (NO en el esófago, recto y rumen).

-

ARR ARR: No detectado en el tracto gastrointestinal

FACTORES GENÉTICOS

La PrP^C está codificada por el gen *PRNP*, el cual se encuentra en el cromosoma 13 en los rumiantes y, en el caso concreto de la oveja, se compone de 31.412 pares de bases, dando lugar a una PrP^C de 256 aminoácidos. A pesar de las variaciones existentes entre las especies, la homología entre ellas es muy alta.

En el gen *PRNP* se han descrito un gran número de polimorfismos, los cuales se pueden clasificar en: a) mutaciones puntuales, en las que el cambio de un nucleótido por otro distinto en un codón del gen da lugar a un cambio aminoacídico en la proteína; y b) inserciones y deleciones de nucleótidos, las cuales tienen lugar en la región de octapéptidos del gen. El desarrollo del scrapie está fuertemente influido por las alteraciones en el gen *PRNP* del hospedador, pudiendo estos polimorfismos influir en la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc}, otorgando así al animal una mayor resistencia o susceptibilidad frente a la enfermedad (Hunter, 1997).

El gen *PRNP* ovino presenta un alto grado de variabilidad habiéndose descrito un total de 37 mutaciones que suponen un cambio aminoacídico en 27 codones distintos. Varios estudios genéticos han demostrado la relación entre las mutaciones habitualmente presentes en los codones 136, 154 y 171, y la susceptibilidad a padecer scrapie. En total se han establecido quince genotipos diferentes por combinación de los haplotipos ARQ, ARR, VRQ, AHQ y ARH (Goldmann *et al.* 1994; Hamir *et al.*, 2005; Sharpe *et al.* 2006), los cuales se clasifican en cinco

grupos en función del riesgo que posee el individuo y su progenie a padecer la enfermedad (Tabla 1) (Dawson *et al.*, 1998).

Tabla 1: Clasificación de riesgo de los cinco alelos y consecuencias para el individuo y su progenie (Dawson *et al.*, 1998).

Riesgo	Genotipo	Riesgo del individuo	Riesgo de la progenie
R1	ARR/ARR	Bajo	Muy bajo
R2	ARR/ARQ	Bajo	Bajo
	ARR/ARH ARR/AHQ		
R3	ARQ/ARH	Bajo	Puede aumentar en función de la información parenteral.
	ARQ/AHQ		
	AHQ/AHQ		
	ARH/ARH		
	AHQ/ARH ARQ/ARQ		
R4	ARR/VRQ	Ocasional	Mayor que la del R3
R5	AHQ/VRQ	Alto	Alto
	ARQ/VRQ		
	ARH/VRQ		
	VRQ/VRQ		

En la actualidad existe un programa de erradicación basado en la selección genética elaborado a partir de esta tabla que favorece la preservación exclusiva de animales con genotipos resistentes. Esto por muy satisfactorio que parezca, puede acarrear como consecuencia que la selección en base a los codones 136, 154 y 171 creé posibles variantes genéticas resistentes o que no se tengan en cuenta los genes productivos.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de esta patología es muy complejo debido a las especiales características del agente causal, ya que al carecer de ácidos nucleicos no se pueden utilizar técnicas basadas en la detección del genoma, como puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *Polymerase Chain Reaction*); ni tampoco pueden aplicarse técnicas serológicas debido a la ausencia de respuesta inmunitaria específica. El diagnóstico clínico y la detección de PrP^{Sc} en tejido obtenido mediante biopsias son los únicos métodos de diagnóstico in vivo. Sin embargo, el primero presenta muchas dificultades ya que el cuadro clínico del scrapie es difuso, no existiendo ningún signo único de la enfermedad; además de que el diagnóstico diferencial es muy complicado debido a la gran cantidad de signos clínicos compartidos con otras patologías

que afectan al SNC. La difusión a tejidos del SLR permite el diagnóstico de los estadios preclínicos mediante biopsias del nódulo retrofaríngeo, la tonsila palatina, el tercer párpado (posee tejido linfoide asociado a la membrana nictitante) y la mucosa rectal (Gregory *et al.*, 1998; Monleón *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006); pero la sensibilidad de esta técnica es muy inexacta debido a que la participación del SLR en la patogenia puede variar considerablemente. Así pues, los métodos de diagnóstico de las EET reconocidos oficialmente se realizan post mortem en muestras de tejido del SNC (OIE, 2008), más concretamente del tronco del encéfalo.

Examen histológico

El examen histológico consiste en la observación de las lesiones características producidas por la enfermedad en el SNC mediante el uso de microscopía óptica: la degeneración espongiiforme; la gliosis; la degeneración y pérdida neuronal; y la amiloidosis (Wells y McGill, 1992).

La *degeneración espongiiforme* es la principal lesión de esta enfermedad, en la que se observa una vacuolización generalmente bilateral y simétrica del pericarion neuronal y neuropilo de la sustancia gris (espongiosis) en regiones neuroanatómicas concretas (Wells y McGill, 1992; Ligios *et al.*, 2002; OIE, 2008). En el scrapie, el lugar idóneo para la detección de esta vacuolización es el obex o médula oblongada (Detwiler *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 1997; OIE, 2008). El perfil lesional puede variar, dependiendo de factores tales como la cepa o el genotipo del hospedador, aunque muchas veces un perfil lesional uniforme no garantiza el diagnóstico (Bergara McGorum *et al.*, 2002; Ligios *et al.*, 2002).

La *gliosis* es el resultado de la astrogliosis hipertrófica y la activación de la microglía por la vacuolización y degeneración neuronal (Wells *et al.*, 1991; Lazarini *et al.*, 1994; Rezaie y Lantos, 2001; Titeaux *et al.*, 2002). Por último, la *amiloidosis* del Scrapie ovino y caprino presenta placas de forma estrellada, rodeadas de vacuolización en el neuropilo y marcada astrocitosis en el cerebelo y en las áreas rostrales del encéfalo (McBride *et al.*, 1988; Wells *et al.*, 1991; McGill y Wells, 1993; Jeffrey *et al.*, 1998; Glatzel y Aguzzi, 2001).

Técnicas de detección de la PrP^{Sc}

Las técnicas de detección de la PrP^{Sc} se basan generalmente en la detección de la proteína mediante anticuerpos específicos que se unen a la misma. Para ello es preciso realizar previamente la digestión de la PrP^C mediante proteinasa K. Existen distintas técnicas para

detectar la presencia de la proteína: la inmunohistoquímica, el Western Blot y la microscopía electrónica.

La *inmunohistoquímica* (IHQ) permite detectar la presencia de la PrP^{Sc} acumulada en los tejidos mediante el uso de la microscopía óptica, pudiendo determinar su distribución en el tejido, su localización celular y las características morfológicas de la acumulación. Esta técnica posee una alta sensibilidad y especificidad, siendo considerada el método de diagnóstico de referencia por la OIE (Organización Internacional de la Sanidad Animal). Entre sus características principales se encuentra el permitir un diagnóstico de la enfermedad antes de que se observen lesiones histopatológicas, así como que puede utilizarse para analizar biopsias de tejido linfóide y así obtener un diagnóstico *in vivo*. Además de servir para diagnosticar una EET, la IHQ se utiliza como método de diferenciación de cepas, ya que la acumulación de PrP^{Sc} en el encéfalo da lugar a una serie de patrones o tipos de depósito característicos y diferenciables (intraneuronales, estrellados, perivasculares, endimarios, intragliales, subpiales, subependimarios, lineales, de punteado fino o grueso, coalescentes, perineurales o en forma de placas), cuya magnitud se puede valorar en diferentes áreas neuroanatómicas con el fin de elaborar un perfil inmunohistoquímico (González *et al.*, 2002 y 2003).

En cuanto al *Western Blot* (WB), al igual que la IHC, también se basa en la detección de la PrP^{Sc} mediante anticuerpos específicos. Su protocolo está especificado por la OIE donde describe el modo de extracción de la PrP^{Sc} mediante detergentes y unos pasos de ultracentrifugación para conseguir mayor concentración de proteína y una mayor sensibilidad. Además de lo destacado por la OIE, el protocolo también explica el modo de separación mediante el uso de un gel de poliacrilamida utilizando la electroforesis, donde podrán diferenciarse distintos patrones de glicosilación. La técnica se finaliza mediante la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Bradley, 1994). La sensibilidad, por tanto, es dependiente además de la concentración de la proteína; del proceso de extracción y de los anticuerpos utilizados (Madec *et al.*, 1998). Esta técnica se utiliza para confirmar casos en los que las lesiones neuropatológicas son mínimas, o si el tejido se encuentra tan dañado que no es adecuado para un examen histopatológico o inmunohistoquímico. Además, es capaz de detectar la presencia de la PrP^{Sc} en lugares donde la histopatología no había sido capaz (Katz *et al.*, 1992; Madec *et al.*, 2000).

En la *microscopía electrónica* (ME) la detección de las SAF (Fibrillas Asociadas al Scrapie) es la clave, para lo que se realiza una ticción negativa en fracciones subcerebrales del tejido

nervioso. El procedimiento consiste en tratar las fracciones subcelulares del tejido nervioso con detergentes con el fin de: solubilizar la PrP^c y favorecer la agregación de la PrP^{Sc} en forma de varillas, que podrán ser separadas posteriormente mediante la ultracentrifugación. Una vez que se observan a ME se pueden ver de 2 a 4 filamentos, lo que permitirá la diferenciación en dos tipos distintos (Meyer *et al.*, 1986; Stack *et al.*, 1993).

Por último es interesante mencionar los test de diagnóstico rápido, que permiten diagnosticar un elevado número de animales en un tiempo razonablemente corto, siendo mucho menor que el de otras técnicas convencionales como la IHQ o el WB. Los tests se basan en la detección de PrP^{Sc} mediante la utilización de anticuerpos específicos, los cuales son capaces de diferenciar distintas conformaciones, uniéndose específicamente a la PrP^{Sc} y no a la PrP^c o bien por las características de resistencia de la PrP^{Sc} a las proteasas (Grassi *et al.*, 2008). Actualmente existen en el mercado 9 test autorizados para el diagnóstico de la EEB y 7 para el diagnóstico del scrapie.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La multiplicación de la proteína prion en los tejidos linfoides y el sistema nervioso entérico ha sido demostrada en órganos como el intestino delgado, sobre todo a nivel del íleon en las placas de Peyer; y en la válvula ileocecal o en la mucosa rectal. No obstante, en otros órganos del tracto gastrointestinal como son los pre-estómagos de los rumiantes, no ha sido estudiada en profundidad.

El objetivo general de este trabajo es estudiar la presencia de la PrP^{Sc} en los sistemas linfo-reticular y nervioso periférico del tracto gastrointestinal de ovinos afectados por scrapie clásico procedentes de focos de erradicación de la Comunidad Autónoma de Aragón.

A su vez, se han establecido tres objetivos específicos:

- 1.- Realizar un estudio inmunohistoquímico de todos los órganos que forman parte del tracto intestinal de las ovejas seleccionadas: lengua, esófago, rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, válvula ileocecal, ciego, colon y recto.
- 2.- Describir la posible vía de migración que ha seguido la PrP^{Sc} desde su entrada al organismo, así como su distribución por el tracto gastrointestinal.
- 3.- Valorar la posible repercusión de los resultados obtenidos en la definición de los materiales específicos de riesgo en la especie ovina.

METODOLOGÍA

MUESTRAS

Para la elaboración de este estudio se seleccionaron un total de 11 ovinos pertenecientes al banco de tejidos del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Universidad de Zaragoza. Para ello se utilizó la base de datos del Centro, realizando una búsqueda selectiva de individuos que tuvieran las siguientes características comunes:

- Clínica terminal coincidente con scrapie en el momento del sacrificio.
- Diagnóstico postmortem mediante inmunohistoquímica de obex positivo.
- Portadores del genotipo ARQ/ARQ, el más común en el ganado ovino y de susceptibilidad media.
- Procedencia de focos de erradicación de scrapie.

Figura 5: Individuos seleccionados para el estudio.

FOCO 1

O-980
O-986
O-989

FOCO 2

O-1143 O-1152
O-1146 O-1153
O-1150

FOCO 3

O-1165
O-1198
O-1199

Así pues, los animales seleccionados procedían de tres focos de erradicación de scrapie localizados en municipios de la Comunidad Autónoma de Aragón (Figura 5). En su momento, estos animales fueron llevados al Centro donde se les realizó una necropsia completa y sistemática almacenando en el banco de tejidos del Centro muestras de diversos órganos en formaldehído.

MÉTODOS

Una vez seleccionadas las muestras, se llevó a cabo el procesado histológico de las mismas para realizar posteriormente la técnica de inmunohistoquímica con el fin de detectar la presencia de la PrP^{Sc} acumulada en los tejidos mediante el uso de la microscopía óptica.

Fijación y tallado

En primer lugar, se realizó un tallado de los órganos que forman el tracto gastrointestinal en bloques de aproximadamente 2-3 mm de grosor: lengua, esófago, rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, válvula ileocecal, ciego, colon y recto. Estos bloques se introdujeron en cassettes y se dejaron fijar en formol tamponado al 10% unas 24 horas.

Procesado del tejido

Se deshidrató e incluyó el tejido en parafina mediante el uso del inclusor de tejidos TP 1050 y a continuación se montaron los bloques en la consola de parafina colocando el tejido en un molde y dejando que la parafina solidificara a temperatura ambiente sobre una placa fría, formándose así un bloque sólido con el tejido en su interior.

Cortes histológicos

Tras dejar enfriar los bloques durante aproximadamente 2 horas (sobre cubitos de hielo en la nevera) para facilitar el corte posterior, se procedió al corte histológico mediante micrótopo, obteniendo secciones de aproximadamente 4 micras. Estas secciones se depositaron en un baño termostático a aproximadamente 45°C, de forma que los cortes quedan flotando y se estiran eliminando las arrugas que pudieran quedar, momento en el que se recogen con portaobjetos. Por último, se dejaron secar los portaobjetos a 37°C durante toda la noche en una estufa.

Técnica de la inmunohistoquímica

En primer lugar se realizó un desparafinado de las muestras mediante inmersiones seriadas en alcoholes de distintas graduaciones. A continuación se realizó el desenmascarado de epítomos, sometiendo las muestras a un pretratamiento con ácido fórmico, seguido de una digestión con proteinasa K (previamente calentada a 37°C) y un tratamiento a alta presión. Una vez concluido este paso, se introdujeron en el inmuteñidor automático, el cual llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena, la incubación con el anticuerpo específico anti-PrP L42 (1:500; R-Biopharm®), así como el posterior revelado con DAB. Una vez terminado el proceso, se deshidrataron las muestras mediante inmersiones seriadas en alcoholes y se realizó el montaje de las preparaciones finales. El protocolo de inmunohistoquímica se encuentra ampliamente descrito en el Anexo I.

Valoración de las muestras

Mediante el uso de la microscopia óptica, las muestras fueron valoradas en función de la cantidad de depósito de PrP^{Sc} observado en los distintos cortes histológicos, diferenciando el tejido concreto en el que se hallaban. Para ello, se valoró la ausencia (-) o presencia (+) de depósito, estimando de forma subjetiva la cantidad en la que se encontraba (+, ++, +++).

En cuanto a los tejidos en los que pudiera encontrarse, se ha diferenciado entre el linfático y el nervioso. El linfático se encuentra de forma difusa asociado a todos los tramos de intestino (GALT, del inglés: *gut-associated lymphoid tissue*), particularmente en la lámina propia. Además, en íleon y válvula ileocecal se encuentran las llamadas Placas de Peyer, que se caracterizan por ser acumulaciones de nódulos o folículos linfoides situadas en el interior de la mucosa. Por otra parte, el tejido nervioso puede encontrarse en el plexo submucoso de Meissner o en el mientérico de Auerbach. El primero se encuentra en la submucosa y está formado por neuronas post-ganglionares parasimpáticas; mientras que el de Auerbach está situado entre las dos capas musculares que rodean el tracto gastrointestinal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la valoración de la distribución de la PrP^{Sc} en tracto gastrointestinal se pueden observar en las tablas 2 y 3, así como en la figura 6.

Tabla 2: Resultados de la distribución de la PrP^{Sc} en el tracto gastrointestinal de los animales del estudio.

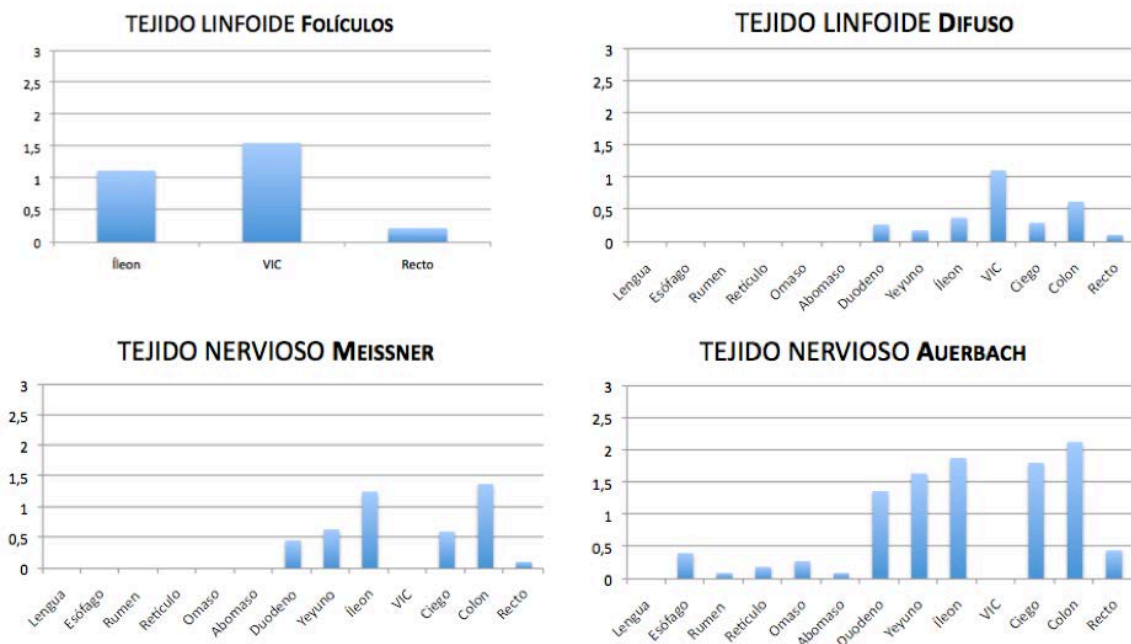
ID	Tejido	Depósito de la PrP ^{Sc}				ID	Tejido	Depósito de la PrP ^{Sc}			
		Linfoide		Nervioso				Linfoide		Nervioso	
		Folículos	Difuso	Meissner	Auerbach			Folículos	Difuso	Meissner	Auerbach
O-980	Lengua	/	-	-	-	O-1143	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	-		Esófago	/	-	-	-
	Rumen	/	-	-	-		Rumen	/	-	-	-
	Reticulo	/	-	-	-		Reticulo	/	-	-	-
	Omaso	/	-	-	-		Omaso	/	-	-	+
	Abomaso	/	-	-	-		Abomaso	/	-	-	-
	Duodeno	/	-	-	-		Duodeno	/	-	-	++
	Yeyuno	/	-	-	-		Yeyuno	/	-	+	++
	Íleon	+	-	-	+		Íleon	-	+	+++	+++
	VIC	++	+	-	-		VIC	-	+	-	-
	Ciego	/	-	-	-		Ciego	/	+	+	++
	Colon	/	-	-	+		Colon	/	/	/	/
	Recto	/	/	/	/		Recto	/	/	/	/
O-986	Lengua	/	-	-	-	O-1146	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	-		Esófago	/	-	-	+
	Rumen	/	-	-	-		Rumen	/	-	-	-
	Reticulo	/	-	-	-		Reticulo	/	-	-	-
	Omaso	/	-	-	-		Omaso	/	-	-	-
	Abomaso	/	-	-	-		Abomaso	/	-	-	-
	Duodeno	/	-	-	+		Duodeno	/	+	+	++
	Yeyuno	/	-	-	+		Yeyuno	/	-	+	++
	Íleon	+	-	+	+		Íleon	/	/	/	/
	VIC	++	+	-	-		VIC	+	+	-	-
	Ciego	/	-	-	+		Ciego	/	-	+	+++
	Colon	/	/	/	/		Colon	/	-	++	+++
	Recto	/	/	/	/		Recto	/	/	/	/
O-989	Lengua	/	-	-	-	O-1150	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	-		Esófago	/	-	-	-
	Rumen	/	-	-	-		Rumen	/	-	-	-
	Reticulo	/	-	-	-		Reticulo	/	-	-	-
	Omaso	/	-	-	-		Omaso	/	-	-	-
	Abomaso	/	-	-	-		Abomaso	/	-	-	-
	Duodeno	/	+	+	++		Duodeno	/	-	+	++
	Yeyuno	/	+	+	++		Yeyuno	/	+	+	++
	Íleon	+	+	+	++		Íleon	/	/	/	/
	VIC	++	+	-	-		VIC	/	/	/	/
	Ciego	/	+	-	++		Ciego	/	+	+	++
	Colon	/	+	++	++		Colon	/	-	+	+++
	Recto	/	/	/	/		Recto	/	+	-	-

Tabla 3 : Resultados de la distribución de la PrP^{Sc} en el tracto gastrointestinal de los animales del estudio.

ID	Tejido	Depósito de la PrP ^{Sc}			
		Linfoide		Nervioso	
		Folículos	Difuso	Meissner	Auerbach
O-1152	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	-
	Rumen	/	-	-	+
	Reticulo	/	-	-	-
	Omaso	/	-	-	+
	Abomaso	/	-	-	+
	Duodeno	/	+	+	++
	Yeyuno	/	-	+	++
	Íleon	+	-	++	+++
	VIC	++	++	-	-
	Ciego	/	/	/	/
	Colon	/	-	++	+++
	Recto	-	-	-	-
O-1153	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	+
	Rumen	/	-	-	-
	Reticulo	/	-	-	+
	Omaso	-	-	-	+
	Abomaso	-	-	-	-
	Duodeno	-	-	-	+
	Yeyuno	-	-	-	+
	Íleon	/	/	/	/
	VIC	++	+	-	-
	Ciego	/	-	-	+
	Colon	/	-	+	++
	Recto	-	-	-	-
O-1165	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	+
	Rumen	/	-	-	-
	Reticulo	/	-	-	+
	Omaso	/	-	-	-
	Abomaso	/	-	-	-
	Duodeno	/	-	-	+
	Yeyuno	/	-	+	++
	Íleon	++	-	+	+++
	VIC	+	+	-	-
	Ciego	/	-	+	+++
	Colon	/	++	++	+++
	Recto	-	-	-	+

ID	Tejido	Depósito de la PrP ^{Sc}			
		Linfoide		Nervioso	
		Folículos	Difuso	Meissner	Auerbach
O-1198	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	-
	Rumen	/	-	-	-
	Reticulo	/	-	-	-
	Omaso	/	-	-	-
	Abomaso	/	-	-	-
	Duodeno	/	-	-	+
	Yeyuno	/	-	-	++
	Íleon	-	-	+	+
	VIC	/	/	/	/
	Ciego	/	-	+	++
	Colon	/	/	/	/
	Recto	+	+	-	-
O-1199	Lengua	/	-	-	-
	Esófago	/	-	-	+
	Rumen	/	-	-	-
	Reticulo	/	-	-	-
	Omaso	/	-	-	-
	Abomaso	/	-	-	-
	Duodeno	/	-	+	+
	Yeyuno	/	-	+	++
	Íleon	+++	+	+	+
	VIC	++	+	-	-
	Ciego	/	-	+	++
	Colon	/	++	+	++
	Recto	/	/	/	/

Figura 6: Valoración de los depósitos de PrP^{Sc} en los animales del estudio.



LOCALIZACIÓN DE DEPÓSITOS DE PrP^{Sc}

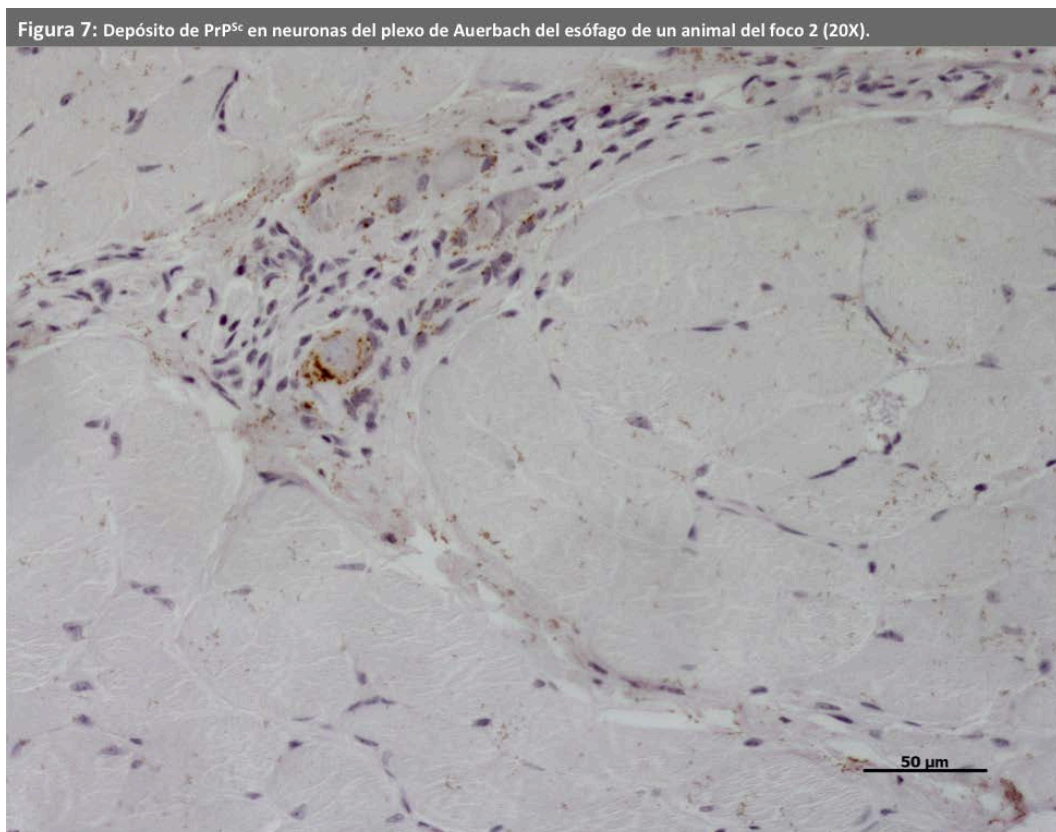
Los resultados obtenidos muestran que todos los animales del estudio presentaban acumulación de PrP^{Sc} tanto en tejido linfoide como en tejido nervioso, aunque con significativas diferencias en cuanto a la cantidad y localización de los depósitos. A continuación, se procederá a describir lo observado en los distintos cortes estudiados del tracto gastrointestinal.

Lengua

En el caso de la lengua, no se encontró depósito de PrP^{Sc} en ninguno de los animales estudiados. La lengua se trata de un órgano muscular, y difiere enormemente del resto de cortes estudiados en cuanto estructura se refiere. Así, la presencia lógica de depósito de PrP^{Sc} en lengua podría haberse dado en los husos neuromusculares presentes entre las células musculares de la misma (Andreoletti *et al.*, 2004), pero no fue así.

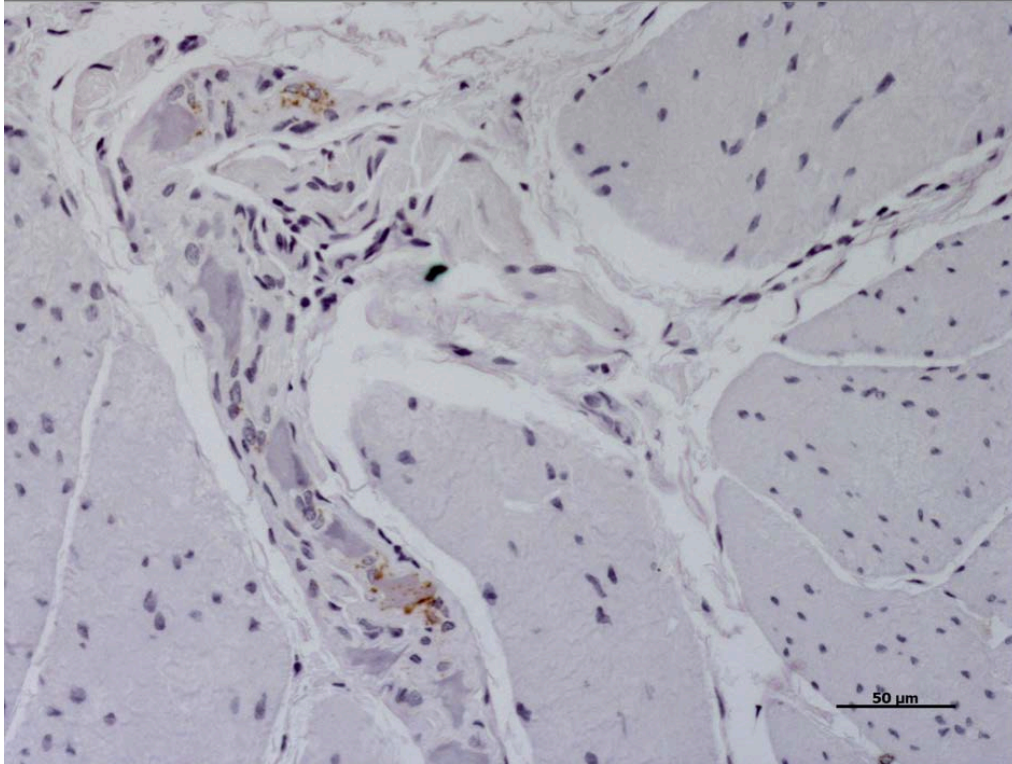
Esófago y estómagos

Se ha observado depósito de PrP^{Sc} en el esófago de tres animales, al igual que en el omaso. En el corte de retículo, se observó depósito en dos ovejas, mientras que en abomaso y rumen sólo se apreció en un individuo. En todos los casos, la acumulación de PrP^{Sc} aparecía únicamente en el plexo mientérico o de Auerbach, en forma de pequeños granulados



intra neuronales (Figuras 7 y 8), estando totalmente ausente en el plexo de Meissner. Tampoco se encontró depósito alguno en tejido linfóide, aunque resulta lógico debido a la escasa presencia de este tejido asociado al esófago y los estómagos. La bibliografía resalta que la presencia de PrP^{Sc} en el esófago y los estómagos es poco común, sobretodo en esófago y rumen en animales ARQ/ARQ (van Keulen *et al.*, 1999), como es el caso de los animales de este estudio.

Figura 8: Depósito de PrP^{Sc} en neuronas del plexo de Auerbach del retículo de un animal del foco 3 (20X).



Intestinos

En el caso de los distintos cortes del tubo intestinal, se ha podido observar una presencia de acúmulo de PrP^{Sc} constante en el plexo de Auerbach de la mayoría de animales, en algunos de ellos en grandes cantidades (figuras 9 y 10). También se han observado depósitos en varios animales en el plexo de Meissner, aunque en menor medida (Figura 10). La presencia de PrP^{Sc} en este último plexo parece estar correlacionada y condicionada por la cantidad de depósito en el plexo mientérico: a mayor cantidad observada en plexo de Auerbach, mayor depósito presente en el plexo de Meissner.

En cuanto al tejido linfóide, se han descrito pequeños depósitos de PrP^{Sc} asociada a tejido linfóide difuso presente en la submucosa de varios cortes intestinales, principalmente a nivel de intestinos (Figura 11). Si nos centramos en los depósitos presentes en folículos linfoides, estos se limitan a los cortes de íleon y válvula ileocecal, ya que son las secciones de intestino en

las que se encuentran las placas de Peyer (Figura 12). También se pudo encontrar algún folículo linfoide en cortes de recto, cuando la sección analizada era muy caudal. Tal y como se puede observar en las tablas, todos los órganos en los que se observó depósito en tejido linfoide, también presentaron acumulación de PrP^{Sc} en ambos plexos entéricos.

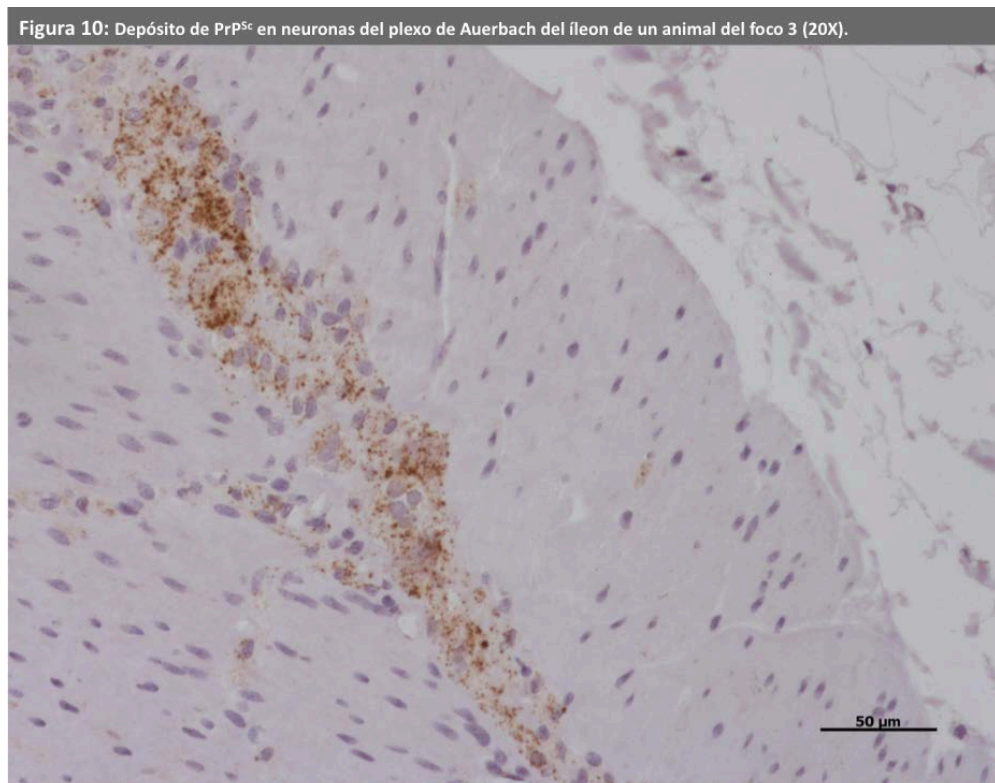
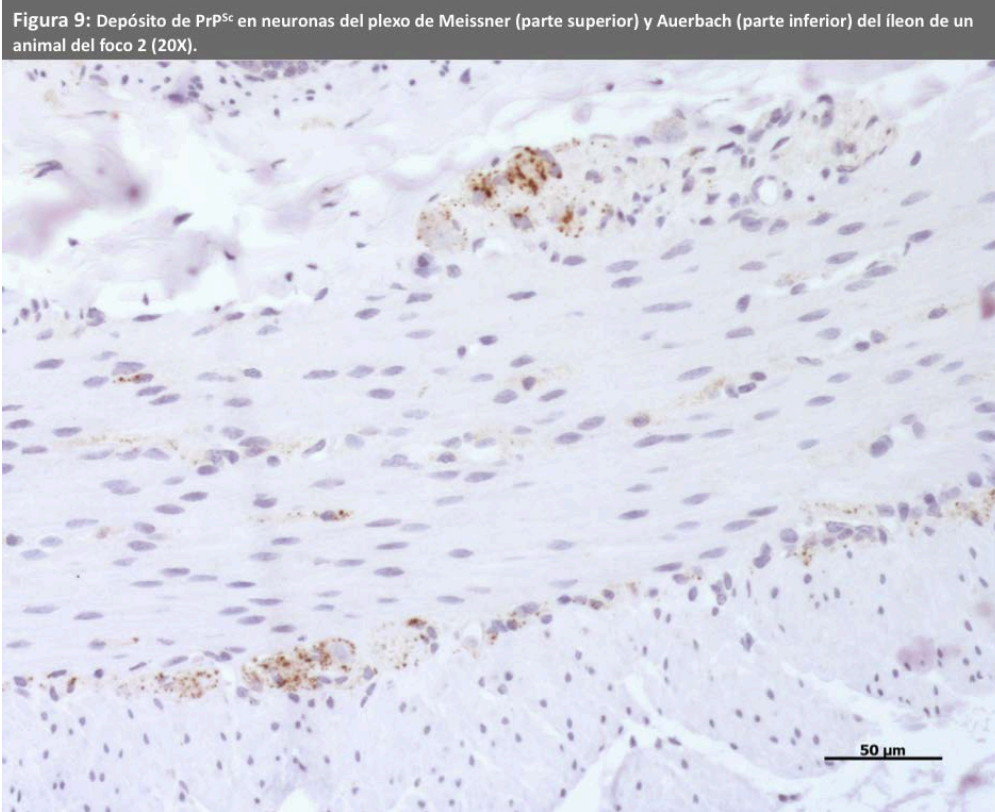


Figura 11: Depósito de PrP^{Sc} en neuronas del plexo de Auerbach y en tejido linfoide asociado a colon de un animal del foco 3 (5X).

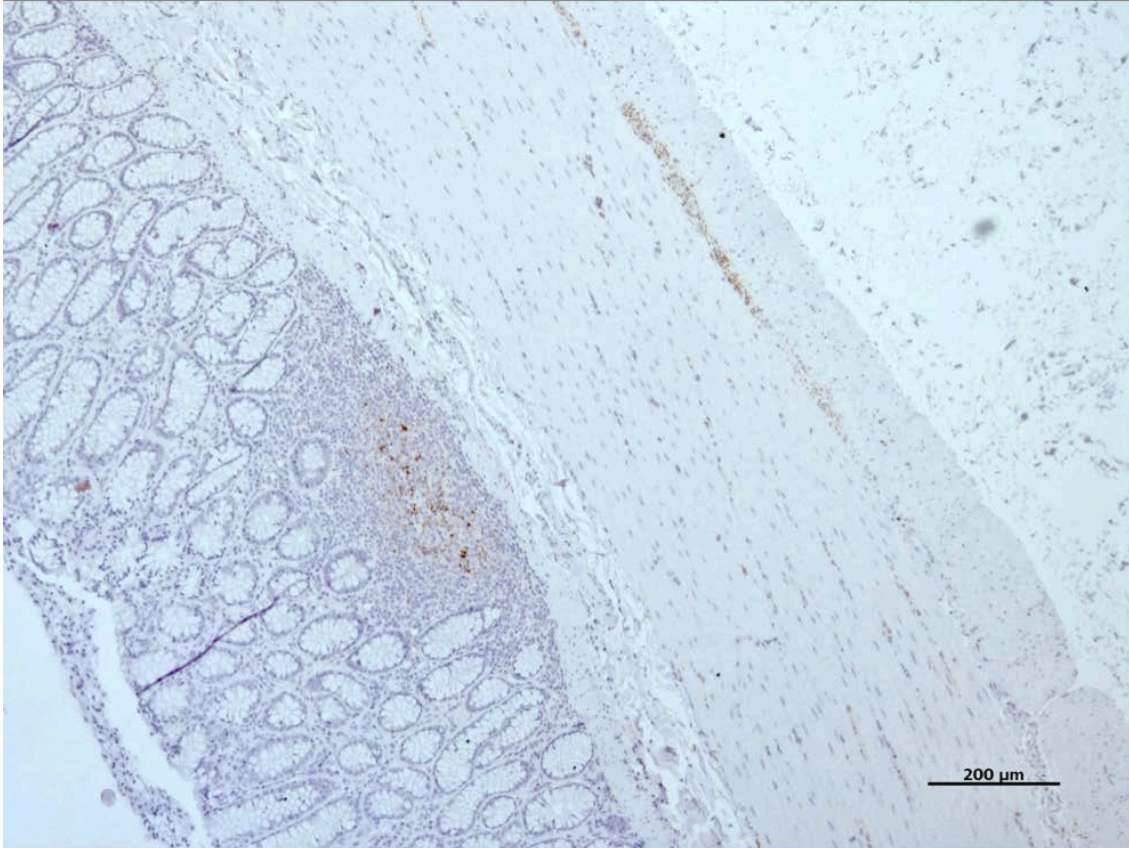
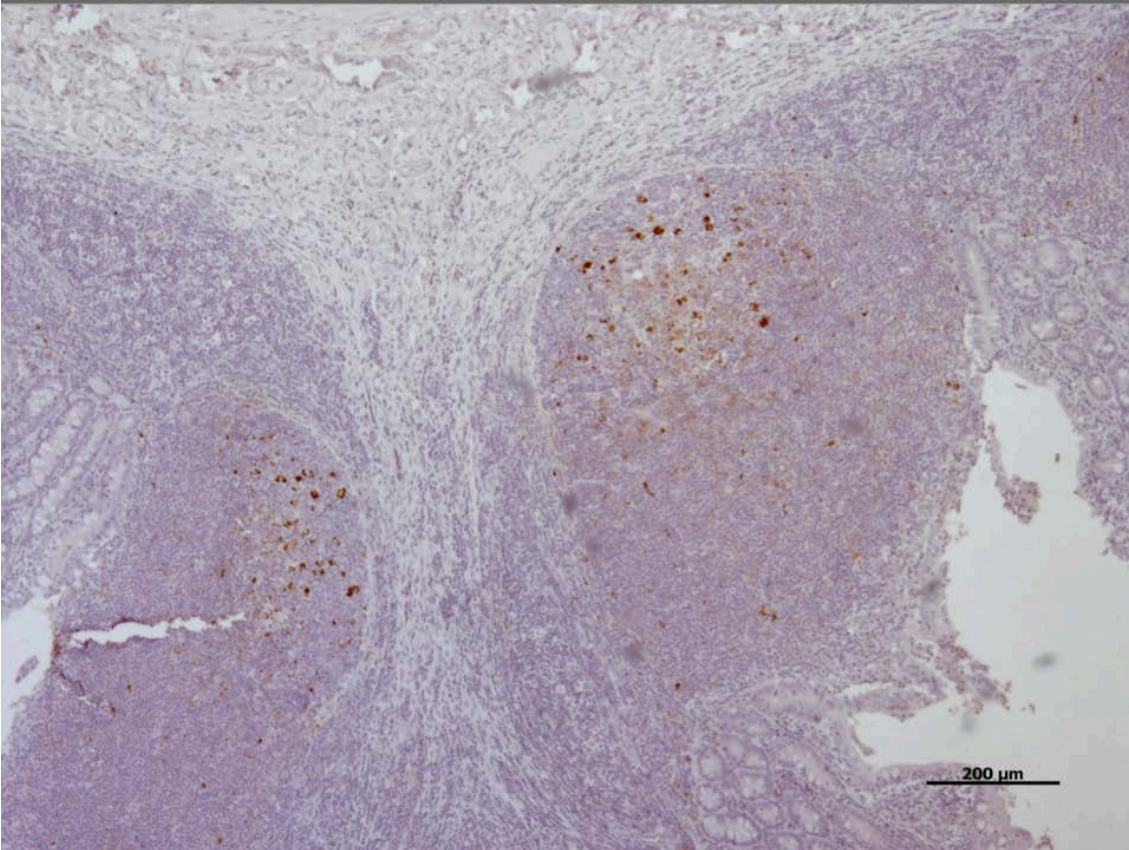


Figura 12: Depósito de PrP^{Sc} en neuronas en el interior de folículos de la Placa de Peyser de íleon de un animal del foco 2 (5X).

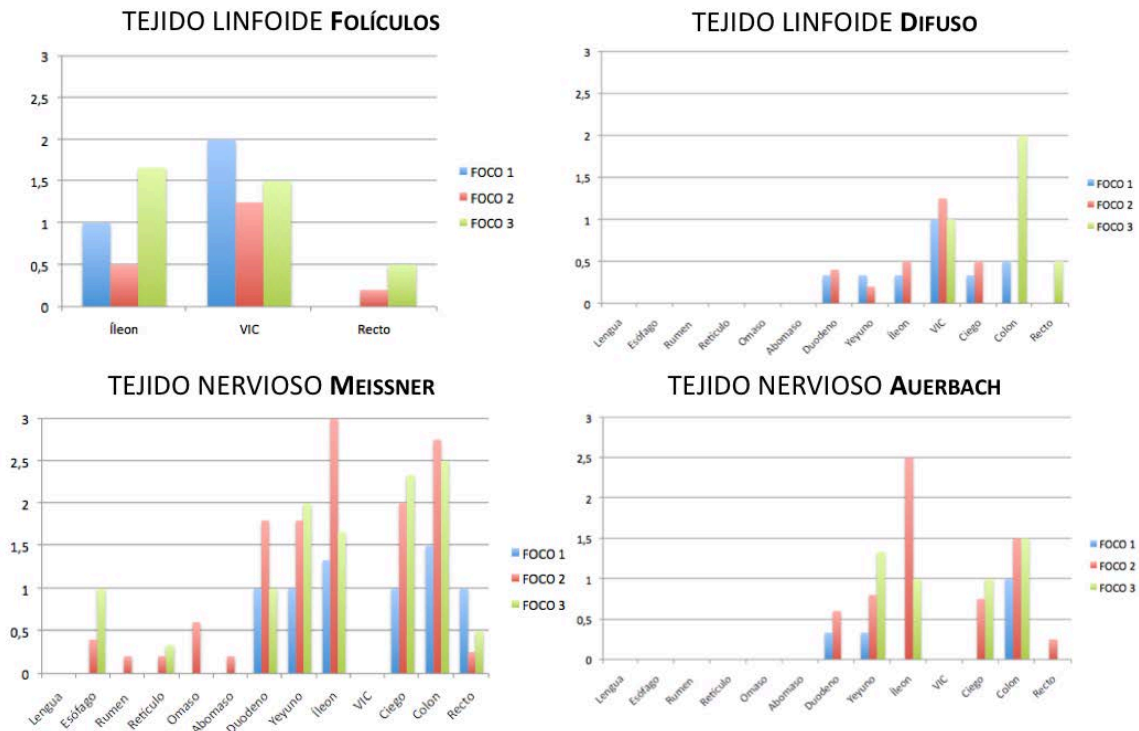


Un caso particular es la válvula ileocecal. Todos los animales fueron positivos para PrP^{Sc} en el interior de folículos asociados a esta, pero a su vez todos fueron negativos en ese corte en cuanto a depósito en los plexos entéricos se refiere. Esto podría explicarse por la forma de tallar esta muestra concreta, haciendo siempre el corte en la invaginación que produce el íleon al entrar en el ciego, de forma que nos aseguramos de conseguir la mayor cantidad de folículos posibles, pero apenas obteniendo área de las capas submucosa y muscular, que quedan comprimidas.

DIFERENCIAS ENTRE FOCOS

Si analizamos cada foco por separado, en el caso del **foco 1** podemos apreciar que en el tejido linfoide sólo se ha podido encontrar presencia de PrP^{Sc} en folículos linfoides de íleon y VIC en todos los animales, así como en tejido linfoide difuso en varias secciones de intestino en un único animal. En lo que se refiere a la presencia de depósito en el sistema nervioso entérico, la PrP^{Sc} parece diseminarse por ambos plexos a lo largo del tubo intestinal, pero sin llegar a alcanzar los estómagos ni el esófago (Figura 13).

Figura 13: Valoración de los depósitos de PrP^{Sc} en los animales del estudio, agrupándolos por foco.



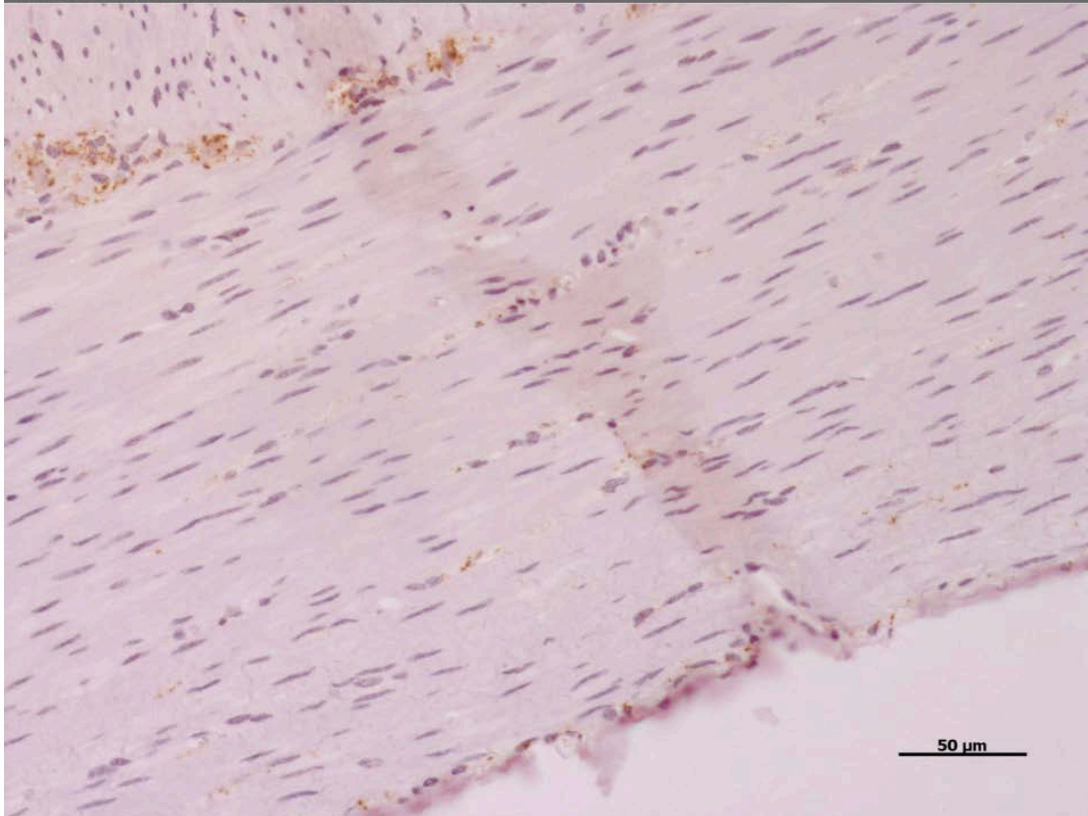
En el **foco 2**, la presencia de PrP^{Sc} en el tejido linfoide es similar al primer foco: acumulación de PrP^{Sc} en folículos linfoides únicamente en íleon y VIC, y pequeños agregados en tejido linfoide difuso asociado al tubo intestinal. En el tejido nervioso, a diferencia del foco anterior, la cantidad de proteína encontrada ha sido muy superior, además de diseminarse más

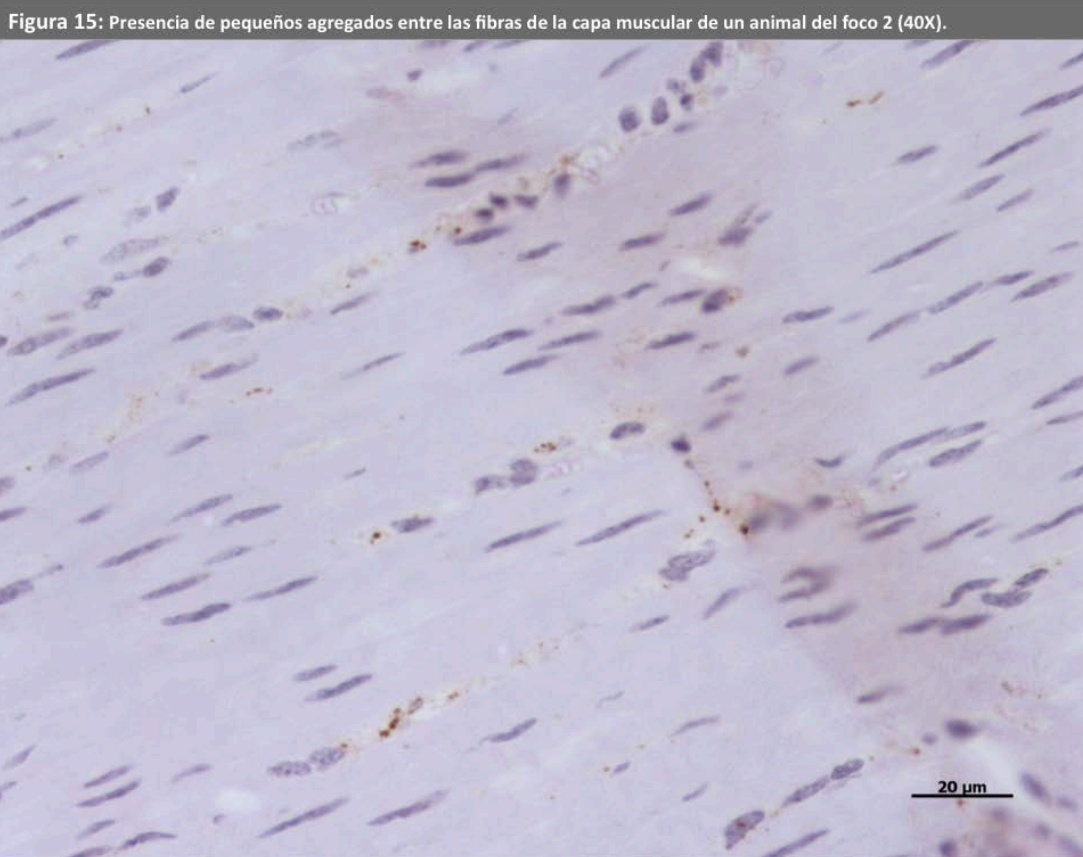
ampliamente por los plexos entéricos, alcanzando los estómagos e incluso el esófago en dos animales (Figura 13).

En el **tercer foco**, los resultados son muy similares al foco 2 tanto en presencia de PrP^{Sc} asociada a tejido linfoide como a tejido nervioso, aunque sí es cierto que la cantidad en la que se presenta es ligeramente inferior. Por otra parte, únicamente se han encontrado depósitos fuera del tubo intestinal en tejido nervioso de retículo y esófago (Figura 13).

Es de gran interés mencionar que en los dos últimos focos también se ha observado presencia de un pequeño punteado de PrP^{Sc} en la capa muscular interna así como en la muscularis mucosa (Figuras 14 y 15). Estos hallazgos han tenido lugar en el retículo, duodeno, yeyuno, íleon y ciego de algunos animales del foco 2. En el foco 3, el número de vísceras donde se han encontrado las localizaciones atípicas ha sido menor, únicamente en ciego y recto de un único animal. En todos los cortes en los que se ha descrito este tipo de depósito, en ambos focos, también se ha encontrado gran cantidad de PrP^{Sc} en los plexos entéricos, por lo que podríamos afirmar que ese depósito que observamos en las capas musculares o muscularis mucosa podría estar asociado a terminaciones nerviosas procedentes de ambos plexos que inervan dichas capas.

Figura 14: Depósito de PrP^{Sc} en neuronas en el plexo de Auerbach del colon y presencia de pequeños agregados entre las fibras de la capa muscular de un animal del foco 2 (20X).





Existen evidentes diferencias en la magnitud de depósito de PrP^{Sc} entre los focos, siendo mucho menor la descrita en el caso de los animales del foco 1 que en los otros dos (Figura 13). Esto podría deberse a varios factores descritos en la bibliografía como la cepa patógena, la vía de entrada del agente, la especie del hospedador o la susceptibilidad genética del mismo (Beekes y McBride, 2000; Glatzel y Aguzzi, 2000; van Keulen *et al.* 2002; Heggebo *et al.*, 2003). Si tenemos en cuenta que todos los animales son de la misma especie (ovina), portadores del mismo genotipo (ARQ/ARQ) y suponemos que la entrada se ha realizado por vía oral debido a que son casos naturales, podríamos llegar a sospechar que nos encontramos ante focos afectados por cepas diferentes, de manera que las cepas de los focos 2 y 3 serían más virulentas que la que afectaba al foco 1. Sin embargo, es difícil asegurar esta teoría al tratarse de infecciones naturales no controladas, pudiendo haber otros factores modulantes de los que no somos conscientes.

DISTRIBUCIÓN DE LA PrP^{Sc} E IMPLICACIONES EN LA CADENA ALIMENTARIA

La presencia de gran cantidad de depósito de PrP^{Sc} en el interior de los folículos linfoides de las placas de Peyer del íleon distal (cortes de íleon y VIC) de prácticamente todos los animales del estudio, junto con el hecho de que estos animales proceden de focos de infección natural de scrapie, sugiere que la PrP^{Sc} habría penetrado en el organismo a través de estas estructuras, tal y

como se describe en la bibliografía (Andreoletti *et al.*, 2000). Estudios previos han descrito que a continuación, la PrP^{Sc} pasaría de las células dendríticas a las células nerviosas que inervan los folículos linfoides (Bencksick *et al.* 2001a, Bencksick *et al.* 2001b, Heggebo *et al.*, 2003) llegando a los plexos submucoso y mientérico a nivel del íleon, yeyuno y colon, algo que se corresponde con lo descrito en este trabajo, siendo estos puntos donde se han observado las mayores cantidades de PrP^{Sc} en todo el SNE estudiado. Por último, la PrP^{Sc} habría ido diseminándose por todo el SNE tanto craneal como caudalmente a lo largo del tubo digestivo, y en algunos casos concretos llegando a alcanzar los estómagos e incluso el esófago.

Actualmente existe un plan de vigilancia frente al scrapie con el objetivo de intentar erradicar, o al menos controlar la enfermedad. Sin embargo, al no considerarse una enfermedad zoonótica, las medidas que se toman para evitar la llegada de material contaminada a la cadena alimentaria no son tan estrictas como en el caso de los bovinos y la EEB. Por ello, prácticamente todos los órganos pertenecientes al tracto gastrointestinal de la oveja llegan a la cadena alimentaria. Este trabajo muestra una amplia distribución de la PrP^{Sc} a lo largo de todo el tracto gastrointestinal en casos naturales de scrapie, de manera que la llegada de productos contaminados al consumidor es muy probable. Como ya hemos comentado, si bien es cierto que a pesar de que el scrapie no se considera zoonótico, recientes estudios no descartan esa posibilidad (Cassard *et al.*, 2014), incidiendo en la gran capacidad de salto de especie demostrada por el prion, por lo que sería de gran interés continuar investigando en este campo.

CONCLUSIONES

1. La PrP^{Sc} parece diseminarse por el SNE a partir del punto de entrada en el organismo, el tejido linfóide de placas de Peyer de íleon distal, encontrando las mayores cantidades de depósito en los plexos mientéricos más cercanos a las mismas, a nivel de íleon, yeyuno y colon.
2. La distribución de la PrP^{Sc} en el SNE del tracto gastrointestinal es muy amplia, llegando a alcanzar los estómagos e incluso los extremos del tracto gastrointestinal: esófago y recto. En cuanto a la distribución en GALT, ésta sólo parece darse en los tubos intestinales.
3. Las diferencias encontradas en la distribución y acumulación de la PrP^{Sc} en los distintos focos estudiados, principalmente entre el foco 1 y los focos 2 y 3, sugieren que estos podrían estar afectados por cepas de scrapie distintas.
4. La descripción de presencia de PrP^{Sc} en prácticamente todas las secciones de tracto gastrointestinal supone una gran probabilidad de llegada de material contaminado a la cadena alimentaria a través de productos derivados del tracto gastrointestinal.

CONCLUSIONS

1. PrP^{Sc} seems to spread through the ENS from the point of entry into the body, the lymphoid tissue of Peyer's patches located in the distal ileum, finding the highest amounts of aggregates in the closest myenteric plexus at ileum, jejunum and colon.
2. The distribution of PrP^{Sc} in the ENS of the gastrointestinal tract is extensive, reaching the stomachs and even the ends of the gastrointestinal tract: oesophagus and rectum. In case of distribution through GALT, it only seems to occur in the intestinal tubes.
3. The differences found in the distribution and accumulation of PrP^{Sc} in the different studied outbreaks, mainly between the outbreak 1 and outbreaks 2 and 3, suggest that may be affected by different strains of scrapie.
4. The description of presence of PrP^{Sc} in almost all sections of gastrointestinal tract represents a high probability of entry of contaminated materials in the food chain through products derived from the gastrointestinal tract.

VALORACIÓN PERSONAL

La carrera de veterinaria tiene muchas salidas, esto por una parte es muy beneficioso, pero por otra, durante el periodo de formación no permite explorar todos los campos. Gracias a la realización de este trabajo he podido conocer y experimentar uno de ellos: la investigación.

Desde que comencé a realizar el trabajo ha sido toda una experiencia, al conocer de una manera superficial el mundo del laboratorio y el de las encefalopatías. He podido aprender a realizar distintas actividades laboratoriales como: el tallado de tejidos y su posterior fijación o la prueba de la inmunohistoquímica. También he podido profundizar en conocimientos histopatológicos y en todo lo referente a esta enfermedad. Me siento afortunada de haber podido disfrutar de esta estancia, puesto que el programa de la carrera no me las hubiera podido aportar. Además de la parte práctica que conlleva este campo, con la realización de este trabajo he podido aprender a realizar una revisión bibliográfica, a interpretar los resultados obtenidos y finalmente a realizar una discusión a partir de ellos. La verdad que recomiendo a cualquier estudiante la estancia en este centro, ya que en un futuro las posibilidades de trabajar o visitar uno de ellos no son demasiadas.

Es por eso que agradezco enormemente la ayuda de todos los componentes del departamento, y en especial: a Cristina Acín, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo; a Helen Raksa, por haberme guiado y aconsejado en el laboratorio; y sobre todo, a José Luis Pitarch, que sin su ayuda, paciencia y dedicación incondicional no habría podido haber realizado este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguzzi A. Peripheral prion pursuit. (2001). *J Clin Invest*, 108(5), 661-662.
- Aguzzi A, Heikenwalder M. Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. (2006). *Nat Rev Microbiol*, 97(6), 1726-1739.
- Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grousclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM and Lantier F. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from Romanov flock with natural scrapie. (2000). *J Gen Virol*, 81, 3115-3126.
- Andreoletti O, Iacroux C, Chalbert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F et al. PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. (2002). *J Gen Virol*, 83(10), 2607-2616.
- Andreoletti O, Simon S, Iacroux C, Morel N, Tabouret G, Chabert A, Lugan S, Corbière F, Ferre P, Foucras G., Laude H. Eychenne F., Grassi J & Schelcher F. PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. (2004). *Nature Publishing Group*, 10, 591-593.
- Beekes M, McBride PA and Baldauf F. (1988). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters feed with scrapie. *J Gen Virol*, 79(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. (2000). *Necrosis Lett*, 278(3), 181-184.
- Bencsik A, Lezmi S and Baron T. (2001a). Autonomic nervous system innervation of lymphoid territories in Spleen: a possible involvement of noradrenergic neurons for prions neuroinvasion in natural scrapie. *J Neuroviral*, 7, 447-453.
- Bencsik A, Lezmi S, Hunsmann G and Baron T. (2001b). Close Vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep Spleen. *Dev Immunol*, 8, 235-241.
- Bergara-McGorum I, González L, Simmons M, Hunter N, Houston F, Jeffrey M. (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol*, 127(1), 59-68.
- Bradley R. (1994). Protocols for the laboratory diagnosis and confirmation of BSE and scrapie. European Commission. Directorate General for Agriculture. *Unit for Veterinary Legislation and Zootechnics*. Bruselas.
- Bremaud I, Lugan S, Schelcher F, Barrilet F and Andreoletti O. (2014). Genetic resistance to scrapie infection in experimentally challenged goats. *J Virol*, 88, 2406-2413.
- Bruce ME. (2003). TSE strain variation. *Br Med Bull*, 66, 99-108.
- Bruce ME, Fraser H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 172, 125-138.
- Chianini F, Siso S, Ricci E, Eaton SL, Finlayson J, Pang Y, Hamilton S, Steele P, Reid HW, Cantile C, Sales J, Jeffrey M, Dagleish MP, González L. (2013). Pathogenesis of scrapie in ARQ/ARQ sheep after subcutaneous infection: Effect of lymphadenectomy and immune cell subset changes in relation to prion protein accumulation. *Vet Immunol Immunop*, 152, 348-358.
- Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD, Hunter N. (1998). Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Vet Rec*, 142, 623-625.
- Detwiler LA, Baylis M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, 22, 121-143.
- Detwiler LA. (1992). Scrapie. *Rev Sci Tech*, 11(2), 491-537.
- Ersdal C, Ulvund MJ, Espenes A, Benestad SL, Sarradin P, Landsverk T. (2005). Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol*, 42(3), 258-274.

- Everest SJ, Ramsay AM, Chaplin MJ, Everitt S, Stack MJ, Neale MH, et al. (2011). Detection and localization of PrP^{Sc} in the Liver of Sheep Infected with Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy. *PLoS ONE*, 6(5)
- Foster JD, Hunter N, Williams A, Mylne MJ, McKelvey WA, Hope J, et al. (1996). Observations on the transmission of the scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec*, 138(23), 559-562.
- Garza MC, Monzón M, Marín B, Badiola JJ, Monleón E. (2014). Distribution of Peripheral PrP^{Sc} in Sheep with Naturally Acquired Scrapie. *PLoS ONE*, 9(5).
- Glatzel M, Aguzzi A. (2000). Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect*, 2(6), 613-619.
- Glatzel M, Aguzzi A. (2001). The shifting biology of prions. *Brain Res Rev*, 36(2-3), 241-248.
- Grassi J. (2003). Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests. *Transfus Clin Biol*, 10(1), 19-22.
- Grassi J, Maillat S, Simon S, Morel N. (2008). Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res*, 39(4), 33.
- Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J and Hope J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, 75(5), 989-995.
- González L, Dagleish MP, Martin S, Dexter G, Steele P, Finlayson J, Jeffrey M. (2008). Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *The Veterinary Record*, 162, 397-403.
- González L, Martín S, Bergara McGorum I, Hunter N, Houston F, Simmons M. (2002). Effects of agents strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol*, 126, 17-29.
- González L, Martín S, Jeffrey M. (2003). 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*, 84(Pt5), 1.339-1.350.
- González L, Jeffrey M, Siso S, Martín S, Bellworthy SJ, Stack MJ. (2005). Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *Vet Rec*, 156(26), 846-847.
- Gregori L, Kovacs GG, Alexeeva I, Budka H, Rohwer RB. (2008). Spongiform Encephalopathy Infectivity in Urine. *Emerging Infectious Dis*, Vol. 14, N°9.
- Hamir AN, Kunkle RA, Richt JA, Miller JM, Cutlip RC and Jenny AL. (2005). Experimental transmission of sheep scrapie by intracerebral and oral routes to genetically susceptible sheep Suffolk sheep in the United States. *J Vet Diagn Invest*, 17, 3-9.
- Heggebo R, González L, Press CM, Gunnes G, Espenses A and Jeffrey M. (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 83, 479-489.
- Hoiville LJ. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, 15(3), 827-852.
- Hunter N, PrP genetics in sheep and the application for scrapie and BSE. (1997). *Trends Microbiol*, 5, 331-334.
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*, 83 (Pt 11), 2.897-2.905.
- Jeffrey M, Martin S, Thomson JR, Dingwall WS, Begara-McGorum I and Gonzalez L. (2001). Onset and distribution of tissue PrP accumulation in scrapie-affected Suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsias. *J Comp Pathol*, 125, 48-57.
- Jeffrey M, Goodsir CM, Holliman A, Higgins RJ, Bruce ME, McBride PA. (1998). 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*, 142(20), 534-537.

- Katz JB, Pedersen JC, Jenny AL, Taylor WD. (1992). Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet Digam Invest*, 4(4), 447-449.
- Krüger D, Thomzing A, Lenz G, Kampf K, McBride P, Beekes M. (2009). Faecal shedding, alimentary clearance and intestinal spread of prions in hamsters fed with scrapie. *Vets Res*, 40, 4.
- Lacroux C, Perrin-Chauvineau C, Corbiere F, Aron N, Aguilar-Calvo P, Torres JM, Costes P, Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J and Hope J. (1994). PrP genotype and agent affects in scrapie: change in allelic interaction with the different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, 76 (Pt5), 989-995.
- Lacroux C, Simon S, Benestad SL, Mailliet S, Mathey J, Lugan S, Corbiere F, Cassard H, Costes P, Bergonier D, Weisbecker JL, Moldal T, Simmons H, Lantier F, Feraudet-Tarisse C, Morel N, Schelcher F, Grassi J and Andreoletti O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*, 4.
- Lazzarini F, Boussin F, Deslys JP, Trady M, Dormont D. (1994). Astrocyte gene expression in experimental Mouse scrapie, *J Comp Pathol*, 111(1), 87-98.
- Ligos C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Simmons MM. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol*, 127(1), 45-57.
- Ligos C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M, Maestrale C, Cancedda MG, Madau L and Aguzzi A. (2005). PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med*, 11, 1137-1138.
- Ligos C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M. (2005). PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected with by scrapie and mastitis. *Nat Med*, 11, 1.137-1.138.
- Mabbott NA, Bruce ME. (2001). The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*, 82 (Pt 10), 2.307-2.318.
- Madec JY, Groschup MH, Bushmann A, Belli P, Calavas D, Baron T. (1998). Sensivity of Western blot detection of prion protein PrP^{Res} in natural sheep scrapie. *J Virol Methods*, 75, 169-177.
- Madec JY, Belli P, Calavas D, Baron T. (2000). Efficiency of Western Blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France. *Vet Rec*, 146(3), 74-76.
- Maignien T, Lasmezias CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP. (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol*, 80 (Pt 11), 3.035-3.042.
- Maluquer de Motes C, Grassi J, Simon S, Herva ME, Torres JM, Pulmarola M. (2008). Excretion of BSE and scrapie prions in stools from murine models. *Vet Microbiol*, 131, 205-211.
- Mark D. Zabel and Crystal Reid. (2015) A brief history of prions. *FEMS Pathogens and Disease*, 73.
- McBride PA, Bruce ME, Frase H. Immunostaining of scrapie-associated fibrils (SAF). (1998). *Neuropathol Appl Neurobiol*, 14(4), 325-336.
- McGill IS, Wells GAH. Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy. (1993). *J Comp Pathol*, 108, 241-260.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prisiner SB. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(8), 2.310-2.314
- Miller MW, Williams ES, Hobbs NT, Wolfe LL. (2004). Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg Infect Dis*, 10 (6), 1.003-1.006.
- Mohan J, Brown KL, Farquhar CF, Bruce ME, Mabbott NA. (2004). Scrapie transmission following exposure through in the skin dependent of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *J Dermatol Sci*, 35(2), 101-111.

- Monleón E, Monzón H, Hortells P, Bolea R, Acín C, Vargas F. (2005). Approaches to scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid test on central nervous and lymphoreticular systems. *J Virol Methods*, 125(2), 165-171.
- Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol*, 86, 231-235.
- OIE. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4^a ed. Paris: OIE, 2008.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE. (1993). Conversion of alfa-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10962-10966.
- Prusiner SB. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Prusiner SB. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(23), 13.363-13.383.
- Race R, Oldstone M and Cheserebro B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in Peripherals nerves and Spleen. *J Virol*, 74, 828-833.
- Rezaie P, Lantos PL. (2001). Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Rev*, 35, 55-72.
- Ryder S, Dexter G, Bellworthy S, Tongue S. (2004). Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Res Vet Sci*, 76(3), 211-217.
- Ryder SJ, Dexter GE, Heasman L, Warner R and Moore SJ. (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res*, 5, 9.
- Safar JG, Lessard P, Tamgüney G, Freyman Y, Deering C, Letessier F. (2008). Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis*, 198, 81-89.
- Salazar E, Monleon E, Bolea R, Acin C, Perez M, Alvarez N, Leginagoikoa I, Juste R, Minguíjon E, Reina R, Glaria I, Berriatua E, de Andres D, Badiola JJ, Amorena B and Lujan L. (2010). Detection of PrP^{Sc} in lung and mammary gland is favoured by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Vet Res*, 41, 58.
- Sharpe A, McElroy M, Bassett H and Sweeney T. (2006). Clinical and pathological features of experimental scrapie in Irish Blackface Mountain sheep. *Res Vet Sci*, 80, 71-78.
- Siso S, Jeffrey M, González L. (2009). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 35 (3), 232-246.
- St Rose SG, Hunter N, Matthews L, Foster JD, Chase-Topping ME, Kuruk LE. (2006). Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis*, 6:5.
- Stack MJ, Scott AC, Done SH, Dawson M. Scrapie associated fibril detection on decomposed and fixed ovine brain material. (1993). *Res Vet Sci*, 55, 173-178.
- Taylor DM, McConnell I, Fraser H. (1996). Scrapie infection can be established readily through the skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol*, 77(Pt 7), 1.595-1.599.
- Titeux M, Galou M, Gomes FCA, Dormont D, Neto VM, Paulin D. (2002). Differences in the activation of the GFAP gene promoter by prion and viral infections. *Mol Brain Res*, 109(1-2), 119-127.
- Tuo W, O'Rourke K, Zhuang D, Cheevers W, Spraker T. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie infected sheep. *PNAS*, 99(9), 6.310-6.315.
- Urtenber U, Voigtlander T, Budka H. Pathogenesis of prion disease. (2005). *Acta Neuropathol*, 109(1), 32-48.

- Van Keulen LJ, Vromas ME and van Zijderveld FG. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, 110, 23-32.
- Van Keulen LJM, Schreuder BEC, Vromans MEW, Langeveld JPM and Smits MAJ. (1999). Scrapie-associated Prion Protein in the Gastro-intestinal Tract of Sheep with Natural Scrapie. *Comp. Path*, Vol. 121, 55–63.
- Vargas F, Luján L, Bolea R, Monleón E, Martín-Buriel I, Fernández A. (2006) Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, 20(1), 187-193.
- Vascellari M, Nonno R, Mutinelli F, Bigolaro M, Di Bari MA, Melchiotti E. (2007). PrP^{Sc} in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol*, 81, 4.872-4.876.
- Wrathall AE, Brown KF, Sayers AR, Wells GA, Simmons MM, Farrelly SS. (2002). Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet Rec*, 150, 365-378.
- Wells GA, McGill IS. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*, 53(1), 1-10.
- Wells GA, Spencer YI, Haritani M. (1994). Configurations and topographic distribution of PrP in the central nervous system in bovine spongiform encephalopathy: an immunochemical study. *Ann NY Acad Sci*, 724, 350-352.
- Wells GA, Wilesmith JW. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol*, 5(1), 91-103.
- Wood JLN, McGill IS, Done SH, Bradley R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of the brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, 140, 167-174.

ANEXO I: Procesado inmunohistoquímico para la detección de la PrP^{Sc}

DESPARAFINAR:

- Xilol: 3 min x 2 veces
- Etanol 99%: 3 min x 2
- Etanol 96%: 1 min
- Etanol 70%: 1 min
- Pasar las preparaciones a agua destilada
- No dejar secar las preparaciones a partir de este punto.

DESENMASCARADO DE EPITOPOS

- Pretratamiento con ácido fórmico: 15 min
 - * Inmersión de las secciones en ácido fórmico (98%): 15 min
 - * Lavar en agua del grifo corriente (constante): 10 min
 - * Pasar a agua destilada
- Digestión con proteinasa K: 4 microgramos/ml - 15 min - 37°C
 - * Añadir 800 microlitros del stock de proteinasa K a 200 ml de buffer precalentado
 - * Inmersión de las secciones en la solución: incubar 15 min a 37°C
- Tratamiento con olla a presión
 - Llenar la olla con 2 litros buffer citrato (1x): 1800ml de Agua destilada y 200ml de buffer citrato al 10x.
 - Inmersión de las secciones en cestillos
 - Calentar a max. Tª hasta que suba la válvula, mantener en estas condiciones 2 min
 - Cuando enfríe pasar se las secciones a agua destilada.
 - Después pasar las preparaciones a wash buffer 1x

BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA

- Cubrir la muestra con 150-200 microlitros de solución bloqueante de la peroxidasa: 5 min
 - * Opcional: inmersión en solución 3% peróxido de hidrógeno en metanol: 15 min
- Lavado: TBS

INCUBACIÓN CON ATC 1º

- Incubar con 150 - 200 microlitros con anticuerpo primario: 30 min a RT.
 - L42 (1/500) 1 microlitro de anticuerpo por cada 500 microlitros de diluyente.
- Los controles los incubaremos con L42 (1/500) y otro sin anticuerpo.
- Lavado: TBS

INCUBACIÓN CON EL POLÍMERO MARCADO (ENVISION)

- Incubar envision mouse (150 - 200 microlitros): 30 min a RT
- Lavado: TBS

REVELADO CON DAB PLUS (ENVISION KIT)

- Incubar con DAB: 10 minutos (1 gota de cromógeno por mililitro de buffer)
- Lavado: agua destilada

* El DAB se inactiva con lejía

TINCIÓN

- Teñir con hematoxilina: 5 min
- Lavado: agua destilada

DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE

- Alcohol 70º: inmersión (x 3)
- Alcohol 96º: inmersión (x 3)
- Alcohol 100º: inmersión (x 3)
- Alcohol 100º: inmersión (x 3)
- Xilol: inmersión (x 3)
- Xilol: inmersión
- Montar en DPX