ITEA (2001), Vol. 97A N.° 2, 131-144

BASE GENÉTICA DE LA RESISTENCIA-SUSCEPTIBILIDAD A LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN LAS ESPECIES BOVINA Y OVINA

C. Díaz*,[1], M. Serrano*, J.M. Torres**

* Dpto. de Mejora Genética Animal, SGIT-INIA, Ctra. de La Coruña, km 7,5, 28040 Madrid, España, e-mail:cdiaz@inia.es

** Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA-INIA, Ctra. Algete-El Casar, 28130 Valdeolmos, Madrid, España

RESUMEN

Las Encefalopatias Espongiformes Transmisibles (EETs) engloban un grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones que se caracterizan por la acumulación en el cerebro de una proteína infectiva (PrP^{Sc}) altamente insoluble y resistente a proteolisis. La PrP^{Sc} corresponde a la isoforma patógena de la proteína celular (PrP^{c}), una metaloproteína entre cuyas características destaca su capacidad para el transporte de cobre. La isoforma patógena se deriva de la forma celular a través de un proceso postraduccional que probablemente sólo implica un cambio en la estructura secundaria de la proteína, de tal forma que la secuencia de aminoácidos de la PrP^{C} y la PrP^{Sc} es idéntica. La proteína priónica está codificada por un gen cromosómico denominado Prn-p o PRNP, el cual contiene dos o tres exones dependiendo de la especie. Este gen está altamente conservado y presenta una gran homología entre especies.

Se han descrito diversas variantes polimórficas naturales en el gen de la PrP que determinan la resistencia o susceptibilidad a esta enfermedad. Dichas variantes son bien mutaciones puntuales que producen cambios aminoacídicos en la proteína dando lugar a polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o inserciones y deleciones que afectan al número de repeticiones de un octapéptido. Por lo general, se puede decir que cuanto mayor es el número de repeticiones mayor es la susceptibilidad a la enfermedad. Estas variantes polimórficas han sido relacionadas con la EET en humanos. En ganado bovino no ha sido establecida la relación entre ciertos polimorfismos y la EET, aunque existen indicios (estudios de asociación, epidemiológicos y de homología con otras especies) que fundamentarían las existencia de una base genética, también en este caso. En este ganado [bovino], se han encontrado pocos polimorfismos en la fase de lectura abierta (ORF) del gen de la PrP. Los que se han descrito, hasta la fecha, generalmente afectan al número de repeticiones del octapéptido en combinación con SNPs en estas mismas regiones. En ganado ovino, la resistencia-susceptibilidad a la EET ovina (*scrapie*) y posiblemente a la EEB, viene determinada por el polimorfismo de los codones 136, 154 y 171, en la ORF del gen de la PrP. Los animales portadores del alelo ARR y AHQ son resistentes a la enfermedad y los VRQ susceptibles, existiendo una situación

1. Autor al que debe dirigirse la correspondencia.

variada de distintos grados de susceptibilidad de los heterocigotos en distintas razas. Así, en esta especie, la selección puede constituirse a corto plazo como una herramienta eficaz en la prevención de dicha enfermedad.

Palabras clave: PrP, EET; EEB, Scrapie, Vacuno, Ovino, Selección.

SUMMARY

GENETIC BASIS OF RESISTANCE-SUCEPTIBILITY TO TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATIES IN THE BOVINE AND OVINE SPECIES

Transmissible Spongiform Encephalopaties (TSEs) are a group of neurodegenerative diseases caused by prions. All TSEs are characterised by an accumulation of an abnormal infectious form of the protein (PrP^{Sc}) in the brain. This protein is a pathogenic insoluble and partially proteinase-resistant isoform of the cellular PrP (PrP^{C}), a copper binding protein. The pathogenic isoform is derived from the PrP^{C} by a postranslational process which probably only implies a change in the secondary structure of the protein, since the sequence of amino acids of both proteins is the same. Prion protein is encoded by a highly conserved chromosomal gene named Prn-p or PRNP. This gene contains two or three exons, depending on species, with a high degree of homology among them.

Several natural polymorphic variants of the PrP gene have been described as involved in resistance-susceptibility to TSE. Such polymorphisms are either point mutations producing a change in the aminoacidic composition of the protein (single nucleotide polymorphisms (SNPs) or insertions and deletions affecting the number of octarepeats. There seems to be a direct relationship between the number of octarepeats and the susceptibility to the disease, the higher the number of octarepeats the more the susceptibility to disease. This type of variants has been related to TSE in humans. In cattle, there is not evidence for an association between particular PrP gene polymorphisms and BSE although there are some indications (epidemiological, association studies and homology with other species) which also support the existence of a genetic basis. A few polymorphisms in the ORF of the PrP gene have been found, in cattle. They generally affect the number of octarepeats, combined with SNPs in these regions. In sheep, the resistance/susceptibility to scrapie, and possibly to BSE, is determined by polymorphisms in codons 136, 154 and 171 located in the ORF of the PrP gene. Homocygous animals for alleles ARR and AHQ are resistant to scrapie and those for alleles VRQ are susceptible. However, heterocygous show different degrees of susceptibility, in different breeds. Thus, in sheep, selection may become in a short period of time, a useful tool for prevention of TSE.

Key words: PrP, TSE; BSE, Scrapie, Cattle, Sheep, Selection.

Introducción

La FAO ha puesto de manifiesto la necesidad de que todos los países presten atención a las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) ya que en algunos países europeos han desencadenado un importante problema de salud pública. En 1996, se describió el primer caso de la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) que ha sido asociada a la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB; HAGENNAARS *et al.*, 2000). Por el momento, en junio del 2001 el número de

personas afectadas por esta enfermedad ascendía a 102 casos declarados oficialmente en el Reino Unido, 3 en Francia y 1 en Irlanda. Sin embargo, aunque el número de casos no resulte todavía alarmante en el Reino Unido, se estima que la incidencia real de la vCJD ha tenido un incremento anual del 23% entre los años 1994 y 2000 (BALTER, 2000) y que las predicciones sobre el número de casos esperados asciende a unos 136.000 (BALTER, 2000). Si las previsiones de los epidemiólogos se cumplen, el grado de desconfianza que ello puede generar en el consumidor español es impredecible aunque no llegue a detectarse ningún caso de vCJD en nuestro país.

El *scrapie*, representante típico de estas enfermedades en el ganado ovino, había sido considerado tradicionalmente como de menor importancia frente a enfermedades infecciosas mucho más virulentas (CUILLÉ y CHELE, 1939). Sin embargo, a partir de 1986 en que se diagnosticó por vez primera la EEB en ganado vacuno (WELLS *et al.*, 1987; WILESMITH *et al.*, 1988), los priones han dado lugar a una epizootia de grandes dimensiones y hondo calado en la opinión pública. Aunque no se ha descrito ninguna relación entre la enfermedad en ovino y la EET en el hombre, existen indicios basados en resultados experimentales que hacen que no pueda descartarse la aparición de una nueva variante de la enfermedad en ovejas alimentadas con harinas contaminadas con EEB y que ésta, pudiera presentar una transmisión horizontal a los seres humanos, rompiendo la barrera interespecífica ovina-humana.

En nuestro país, es difícil cuantificar la incidencia de las EETs en las distintas especies rumiantes aunque sus efectos se dejan notar día a día especialmente en lo concerniente al ganado vacuno. Desde que aparecieron los primeros casos de bovinos afectados por la enfermedad se ha producido una disminución rápida en el consumo de carne de esta especie, un incremento de los costes de producción por el gasto de la retirada de los materiales específicos de riesgo (MER), sin olvidar el posible problema medioambiental que puede generar la retirada de los animales afectados. Según una encuesta del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), la disminución en el consumo de carne de vacuno en nuestro país ha llegado a un 48%. Esta disminución pone de manifiesto que la alarma generada entre los consumidores es considerable, y ha supuesto un cambio en los hábitos de consumo de las familias españolas. Se estima que el coste de retirada y eliminación de animales de las granjas asciende a 14.000 millones de pesetas anuales. No obstante, si incluimos los costes de intervención del Fondo Europeo de Garantía (FEGA), los costes de eliminación de despojos de matadero y el lucro cesante del sector como consecuencia de la crisis, podríamos estar hablando de unos 150.000 millones de pesetas anuales. Todo ello nos sitúa ante un problema de salud pública que además afecta los intereses económicos de un amplio grupo de sectores, especialmente los productores de vacuno y ovino.

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) engloban un grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones que afectan a diferentes especies animales incluida la humana. Todas ellas se caracterizan por la acumulación en el cerebro de una proteína infectiva (PrP^{Sc}), altamente insoluble y parcialmente resistente a la proteolisis, correspondiente a la isoforma patógena de la proteína celular (PrP^{C}).

Entre las encefalopatías espongiformes descritas en animales, las de mayor repercusión han sido la EEB también conocida como "enfermedad de las vacas locas" y la Encefalopatía Espongiforme Ovina también conocida como "tembladera" o *scrapie*. En la especia humana hay que destacar la enfermedad

de Creutzfeldt-Jakob (CDJ); la nueva variante (vCJD) descubierta en marzo de 1996 y que ha sido asociada a la ingestión de material infectado con EEB; el Insomnio Familiar Fatal o Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker y el Kuru. Un gran número de evidencias sugieren que una isoforma anormal de la PrP^{C} (PrP^{Sc}) es la responsable de la infectividad "hipótesis del prión" (PRUSINER *et al.*, 1990). De acuerdo con esta hipótesis, los priones se componen de una proteína denominada PrP^{Sc}. La PrP^{Sc} se produce a través de un proceso postraduccional (GABIZON y PRUSINER, 1990) consistente en el plegamiento erróneo de una proteína celular de idéntica secuencia de aminoácidos, presente en prácticamente todos los tejidos del organismo, denominada PrP^{C} (isoforma celular de la proteína del prión). Este plegamiento erróneo confiere a la PrP^{Sc} dos propiedades que permiten diferenciarla de la PrP^{C}, la resistencia parcial a la digestión por proteasas y la insolubilidad (PAN *et al.*, 1993). La PrP^{C} madura, purificada en su forma nativa tiene una estructura secundaria compuesta por un 43% de α-hélice y un 3% de lámina β. Por el contrario, los estudios espectroscópicos permitieron establecer que la estructura secundaria de la PrP^{Sc} contiene un 43% de lámina β lo que le confiere la capacidad de formar complejos supramoleculares acumulables denominados amiloides (PAN *et al.*, 1993).

La estructura terciaria de la PrP^{C} humana y bovina ha sido desvelada recientemente (ZAHN *et al.*, 2000; LÓPEZ *et al.*, 2000). Ésta consiste en tres α-hélices que conforman un núcleo ordenado en el extremo carboxilo terminal de la molécula y una zona amino terminal desestructurada y flexible. Se ha propuesto que la transformación de PrP^{C} a PrP^{Sc} consiste en una transición de las α-hélices a láminas β, coincidiendo con las zonas conservadas de la cadena polipeptídica (ZAHN *et al.*, 2000; LÓPEZ *et al.*, 2000).

La implicación de la proteína celular en la transmisión de los priones se puso de manifiesto al observar que ratones knockout (ratones que no expresan la PrP^{C} al haberse inactivado su gen) eran resistentes a la enfermedad (BUELER *et al.*, 1993), demostrando de manera indiscutible que para la producción de proteína infectiva era necesaria la presencia de la isoforma celular. En estos ratones se podía restablecer la susceptibilidad a los priones murinos reintegrando en el genoma el gen de la PrP (FISCHER *et al.*, 1996).

Se desconocen los mecanismos moleculares de la conversión de la PrP^{C} en PrP^{Sc} aunque probablemente conlleve únicamente un cambio en la conformación de la proteína (BORCHELT *et al.*, 1990). Se han propuesto varios modelos para explicar cual es el mecanismo de propagación de los priones (SAFAR *et al.*, 1996). El primer modelo denominado de desnaturalización-renaturalización atribuye el control cinético al cambio conformacional, que es una etapa limitante ya que implica la desnaturalización de la PrP^{C} y posterior renaturalización. En este modelo la PrP^{C} es el sustrato y PrP^{Sc} el producto de reacción. La velocidad de reacción depende de la concentración del sustrato. La PrP^{Sc} es un efector alostérico que regula la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc}. Un segundo modelo se ha denominado de polimerización nucleada por condensación no covalente. Éste modelo propone que el cambio conformacional está ligado a un equilibrio de asociación de manera que ambas conformaciones existen en equilibrio pero la estabilización de la forma patológica ocurre a través de la formación de un núcleo que constituye la etapa lenta del proceso. Una vez constituido el núcleo, éste crece por adiciones sucesiva y rápidas de nuevas moléculas, disparándose el proceso. Ambos modelos justificarían las tres variantes patológicas. Las patologías infecciosas serían el resulta-

do de la presencia exógena de la PrP^{Sc}, es decir del catalizador o efector del núcleo. Las patologías hereditarias ocurrirían por una desestabilización de la estructura de la PrP^{C} o una estabilización de la estructura de la PrP^{Sc} favoreciendo la oblación del estado patológico. Por último, las enfermedades esporádicas podían surgir por mutaciones somáticas espontáneas que conlleven la formación de la PrP^{Sc}.

Aunque no se han encontrado otras proteínas distintas de la PrP^{Sc} en fracciones enriquecidas en infectividad atribuible a priones, algunos resultados recientes sugieren la presencia de una macromolécula (designada provisionalmente como X) que participa en la formación del prion. Estos resultados indican que mientras que la PrP^{Sc} se une a la PrP^{C} en una región situada entre los aminoácidos 96 y 167, la proteína X se une a aminoácidos situados cerca del extremo COOH-terminal (TELLING *et al.*, 1995).

En los cerebros de animales en fases muy avanzadas de la enfermedad, la proteína infectiva se acumula en amiloides que son síntoma patognomónico de la enfermedad (PRUSINER, 1993). Las placas amiloides también se pueden encontrar en el bazo y los nódulos linfáticos (HOPE y MANSON, 1991).

Bases genéticas de la barrera interespecífica

La proteína del prion (PrP) está codificada por un gen cromosómico denominado Prn-p o PRNP. Este gen contiene 2 o 3 exones, dependiendo de la especie. Dicho gen está altamente conservado (WOPFNER *et al.*, 1999). Mientras que en hamsters el gen de la PrP presenta dos exones y la región codificante del mismo se encuentra en el segundo exón (GOLDFARB *et al.*, 1991), en humanos, ovinos, vacunos y ratones presenta tres exones y es en el tercero donde se encuentra la región codificante de la proteina (INOUE *et al.*, 1997) o la fase de lectura abierta (ORF). El grado de homología del gen entre las distintas especies es muy elevado (PRUSINER *et al.*, 1993; CASTIGLIONI *et al.*, 1998; WOPFNER *et al.*, 1999). La homología descrita entre el gen humano y el gen bovino y ovino es de 66,7% y 65,4%, respectivamente. Así mismo, la homología entre estos dos últimos es del 98% (PRUSINER *et al.*, 1993; HUNTER, 1999).

La expresión del gen y posterior modificación postraduccional da lugar a una glicoproteína de membrana de entre 230 y 250 aminoácidos según la especie (PrP^{C}). Los priones se propagan mediante la transformación de la PrP^{C} en su isoforma patógena (PrP^{Sc}), que a su vez sirve de molde para la transformación de nueva proteína celular. Se trata pues de una enfermedad en la que el genoma del individuo susceptible proporciona tanto el sustrato (PrP^{C}) como el catalizador (PrP^{Sc}) de la transformación patogénica (GABIZON y TARABOULOS, 1997). En el caso de las infecciones a partir de una fuente exógena, la PrP^{Sc} inoculada es el iniciador de la transformación (GABIZON y TARABOULOS, 1997). La eficiencia de la transformación de PrP^{C} en PrP^{Sc} viene determinada por el grado de homología de secuencia entre la proteína exógena y la proteína celular, de tal forma que cuando el agente patógeno (PrP^{Sc}), ingerido o inoculado es de diferente especie y, por tanto, presenta cambios en la secuencia de aminoácidos respecto de la PrP^{C}, los tiempos de incubación hasta la aparición de síntomas se alargan. Por ejemplo, ratones inoculados con proteína de prion de hamster, desarrollan la enfermedad tras 500 días de incubación, mientras que este tiempo se reduce a 130 días cuando los ratones son inoculados con proteína de prion murina. Sin embargo, una vez que el prion transgrede la barrera de especie y por lo tanto adquiere la

secuencia proteica determinada por el gen del huésped, en sucesivas infecciones los tiempos de incubación en la nueva especie se acortan sensiblemente (SCOTT *et al.*,1989). La existencia de esta barrera interespecífica se confirmó mediante la obtención de diferentes líneas de ratones transgénicos que expresaban la PrP^C de hámster. Estos animales fueron más susceptibles a la infección por priones de hámster que los ratones no transgénicos. La expresión de la PrP^C bovina en ratones knockout para la PrP^C murina permitió un ensayo de infectividad de priones bovinos en el que los tiempos medios de incubación fueron de 250 días mientras que en los animales control la infección fue mucho menos eficiente y con tiempos de incubación mucho más largos (SCOTT *et al.*, 1997). Resultados similares han sido obtenidos por TORRES *et al.* (resultados en vía de publicación).

La transmisión experimental también ha sido descrita entre bovinos y ovinos. Así, se han observado vacas enfermas tras ser inoculadas con extractos de cerebros de ovejas afectadas de *scrapie*; sin embargo, la enfermedad desarrollada presentaba características diferenciales con respecto a la EEB conocida (CUTLIP *et al.*, 1997) y las propiedades bioquímicas de la PrP^{Sc} (perfil de glicosilación y "proteasa fingerprinting") también fueron diferentes. Así mismo, se han obtenido ovejas enfermas al ser inoculadas con tejido de vacas afectadas por EEB (FOSTER *et al.*, 1994) aunque al igual que en el caso anterior, la enfermedad desarrollada presentaba características diferenciales.

El gen de la PrP y la resistencia y/o susceptibilidad a las EETs

El gen de la PrP^C presenta variantes polimórficas naturales que determinan la susceptibilidad a la enfermedad (BERR *et al.*, 1998). Entre estas variantes se encuentran las debidas a mutaciones puntuales (PRUSINER, 1998; PRIOLA y CHESEBRO, 1998) y las derivadas de inserciones y deleciones de octapéptidos repetidos (KENNEY *et al.*, 1995). Estudios previos sobre mutaciones puntuales han demostrado que ratones transgénicos que expresaban el gen de la PrP^C murina mutada en la posición 102 (mutación que aparece en una de las encefalopatías espongiformes humanas) desarrollaban una degeneración espongiforme espontánea en 70 días (HSIAO *et al.*, 1990). De igual forma, diversas mutaciones puntuales del gen de la PrP que se traducen en cambios de la estructura aminoacídica de la proteína han sido asociadas a la aparición esporádica de la enfermedad en las especies humana (BROWN, 1994) y ovina (HUNTER *et al.*, 1994a). Por otro lado, ratones transgénicos que expresaban el gen de la PrP^C murina con 14 octapéptidos repetidos, en vez de los 5 octapéptidos naturales, desarrollaban una encefalopatía espongiforme semejante a la causada por priones (CHIESA *et al.*, 1998). Es conocido que esta región con octapéptidos de repetición está implicada en la unión al cobre, el cual parece a su vez, estar implicado en la transformación de PrP^C en PrP^{Sc} (VILES *et al.*, 1999; WHITTAL *et al.*, 2000). Así, la relación entre las variantes polimórficas y las EETs ha sido demostrada en las especies humana, ovina y murina pero aún no lo ha sido en la bovina.

Especie bovina

El gen de la PrP en bovinos ha sido localizado en el grupo de sintenia 11 del cromosoma 13 (BTA 13) (RYAN y WOMACK, 1993; SCHLÄPFER *et al.*, 2000). La primera secuenciación del gen fue realizada por (GOLDMANN *et al.*, 1991) y más tarde ha sido resecuenciado por distintos grupos (YOSHIMOTO *et al.*,

1992; PRUSINER *et al.*, 1993; CASTIGLIONI *et al.*, 1998; SCHLÄPFER *et al.*, 2000; HILLS *et al.*, 2000). Este gen consta de unas 20-22 kpb, es un gen muy conservado y, como se ha mencionado anteriormente, presenta gran homología con los de otras especies.

Al contrario que para otras especies, en el ganado vacuno se ha encontrado, hasta la fecha, poca variación en el gen de la PrP, al menos en lo que se refiere a la zona codificante de dicho gen (HUNTER, 1999; HILLS *et al.*, 2000). En el tercer exón se han descrito dos polimorfismos silentes que afectan a un solo nucleótido (entre ellos está HindII RFLP causado por un cambio de C por T en el nucleótido 576) y que no supone un cambio aminoacídico en la proteína que se traduce. También se han descrito otros polimorfismos que se basan en variaciones en el número de repeticiones de un octa/nonapéptido rico en glicina (Gly) cuya correspondiente secuencia de ADN se encuentra entre los nucleótidos 160-309, aproximadamente. Cada péptido está codificado por 24 a 27 nucleótidos ricos en G-C. Las regiones son muy repetitivas. Por el momento, en el ganado vacuno se han descrito cinco, seis y siete repeticiones (GOLDMANN *et al.*, 1991; BROWN *et al.*; 1993; NEIBERG *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 1997; SCHLÄPFER *et al.*, 1999). La presencia de siete repeticiones del octapéptido ha sido únicamente descrita en la población de Pardo Alpina (SCHLÄPFER *et al.*, 1999). La variación en el número de repeticiones del octapéptido (entre 4 y 14) ha sido asociada a la incidencia de la EETs en otras especies (CHIESA *et al.*, 1998), incluyendo la humana (GOLFARB *et al.*, 1991; POULIER *et al.*, 1992; VITAL *et al.*, 1998). En ésta última se ha descrito que cuanto mayor es el número de repeticiones del octapéptido mayor parece ser la predisposición a la CJD (GOLDFARB *et al.*, 1991).

La asociación entre dichos polimorfismos del gen de la PrP y la presencia o no de EEB no ha sido establecida en el ganado vacuno (HILLS *et al.*, 2000; WILLIAMS 2001 comunicación personal). Sin embargo, el número de trabajos donde se intenta hallar dicha asociación es limitado (GOLDMANN *et al.*, 1991; YOSHIMOTO *et al.*, 1992; PRUSINER *et al.*, 1993; HUNTER *et al.*, 1994b; NEIBERGS *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 1997), fundamentalmente por la carencia de datos epidemiológicos (FERGUSON *et al.*, 1997).

Aunque la asociación polimorfismo-EEB no haya sido establecida, existen indicios que podrían justificar el interés de estudiar el gen de la PrP y/u otros genes bovinos en el contexto de la EEB. Podrían formularse algunos argumentos epidemiológicos en estudios realizados en distintos países que fundamentarían la existencia de una base genética para la EEBs, dado que el comportamiento de la misma varía entre países. En Suiza, en el 97% de las ganaderías afectadas por EEB, la enfermedad tenía una incidencia muy baja, afectando a uno o muy pocos animales (SCHLÄPFER *et al.*, 2000), sin embargo, en el Reino Unido, la dispersión de la enfermedad parece darse de forma distinta; el 80% de los casos de EEB aparecen en el 20% de las ganaderías afectadas (HAGENAARS *et al.*, 2000). Por otra parte, de los genotipos descritos en relación al número de repeticiones del octapéptido, el homocigoto 5:5 nunca ha sido encontrado en asociación con animales enfermos de EEB (GOLDMANN *et al.*, 1991; YOSHIMOTO *et al.*, 1992; PRUSINER *et al.*, 1993; HUNTER *et al.*, 1994b; NEIBERG *et al.*, 1994), si bien es cierto que la frecuencia de este genotipo en la mayoría de las poblaciones bovinas es muy baja, si no inexistente (PREMZL *et al.*, 2000). Se han hecho estudios de frecuencias génicas y genotípicas en distintas poblaciones de ganado vacuno de EE.UU., Bélgica, Escocia, Suiza y Croacia de animales sanos a nivel del número de repeticiones de los octapéptidos (MCKENZIE

et al., 1992; BROWN *et al.*, 1993; GROBET *et al.*, 1994; HUNTER *et al.*, 1994; SCHLÄPFER *et al.*, 1999; PREMZL *et al.*, 2000) y se observa que existe una gran variación en las frecuencias genotípicas de dicho homocigoto entre las distintas poblaciones. Se estima que la frecuencia del homocigoto 5:5 es del 0,5% entre los toros Holstein masivamente utilizados en inseminación artificial en EE. UU. (BROWN *et al.*, 1993) mientras que en la raza Slavonian Syrmian en Croacia (PREMZL *et al.*, 2000) se ha encontrado en una frecuencia del 25%. Parece existir una gran variación en las frecuencias genotípicas para el número de repeticiones de los octapéptidos entre las poblaciones en las que dichas frecuencias han sido descritas. Es cierto que los tamaños muestrales son pequeños, que no existe una descripción exhaustiva de las muestras y así mismo que la mayoría de los efectivos se relacionan con animales de raza Frisona-Holstein y/o sus cruces.

El alelo codificante de 6 octapéptidos parece ser el más frecuente dentro de las muestras estudiadas aunque la frecuencia del codificante de 5 octapéptidos es también muy elevada en algunas poblaciones (MCKENZIE *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1993; GROBET *et al.*, 1994; NEIBERGS *et al.*, 1994; SCHLÄPFER *et al.*, 1999; HILLS *et al.*, 2000; PREMZL *et al.*, 2000). Asociado al alelo 6 se ha detectado un polimorfismo (SNP) que afecta a una única base (alelos A y C) (NEIBERGS *et al.*, 1994; HILLS *et al.*, 2000), observándose que los animales enfermos y aquellos emparentados con ellos presentaban todos el genotipo AA (NEIBERGS *et al.*, 1994; HILLS *et al.*, 2000).

Un aspecto que podría utilizarse en apoyo a la existencia de una base genética para la resistencia-suceptibilidad a la EEB, en el ganado bovino, es la evidencia de asociación genotipo-enfermedad encontrada en otras especies. De hecho, el gen de la PrP está muy conservado (HUNTER *et al.*, 1999) y presenta una gran homología entre las distintas especies (PRUSINER *et al.*, 1993; CASTIGLIONI *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1998; WOPFNER *et al.*, 1999). Incluso entre especies que se diferencian en 130 millones de años de evolución (aves y mamíferos), se encuentran patrones de analogía en las PrPs (WOPFNER *et al.*, 1999). Así, si se trata de un gen tan conservado que presenta una gran homología entre especies, se esperaría poder establecer de forma fácil la asociación entre los distintos polimorfismos y la presencia de enfermedad (HUNTER, 1999).

Cabe la posibilidad de que existan otros polimorfismos no descritos en la zona codificante del gen como sugieren los estudios de NEIBERGS *et al.* (1994) y HILLS *et al.* (2000) o de que como ocurre con otros genes, los polimorfismos responsables estén presentes en regiones no codificantes 5' o 3' del gen que podrían estar involucradas en funciones de regulación de la expresión del gen PrP (JACKSON *et al.*, 1993 citado por HUNTER, 1999). Se han encontrado nuevos polimorfismos que involucran 4 inserciones y/o delecciones así como 15 SNPs con una posible asociación con la EEB en cuatro familias de medios hermanos (HILLS *et al.*, 2000). De los cerca de 30 polimorfismos distintos encontrados en ganado vacuno, la mayoría están en zonas silentes (no codificantes) del gen (WILLIAMS, 2001, Comunicación Personal). Asímismo, se está haciendo un barrido de todo el genoma para encontrar otros genes que pudieran estar relacionados con la susceptibilidad a EEB mediante el uso de microsatélites y marcadores de tipo AFLP o fragmentos amplificados de longitud polimórfica (HILLS *et al.*, 2000) con los que posteriormente se desarrollarán estudios de asociación.

En bovinos existe un interés manifiesto por encontrar algún tipo de asociación entre los polimorfismos encontrados en el gen de

la PrP y la EEB y así poder establecer programas de prevención a través de la selección de individuos resistentes (GOLDMANN *et al.*, 1991).

Especie ovina

En ovinos, el gen de la PrP se sitúa en el cromosoma 13 (CASTIGLIONI *et al.*, 1998) y codifica una proteína de 256 aminoácidos. Se han descrito hasta 14 alelos para dicho gen (LAPLANCHE *et al.*, 1993a; CLOUSCARD *et al.*, 1995; BELT *et al.* 1995; BOSSERS *et al.*, 1996; HUNTER *et al.*, 1996; THORISSON *et al.*, 1998; THORGEIRSDOTTIR *et al.*, 1999), entre los que se encuentran las sustituciones aminoacídicas metionina/tirosina (M/T) en el codón 112, alanina/tirosina/valina (A/T/V) en el 136, metionina/tirosina (M/T) en el 137, serina/asparagina (S/N) en el 138, leucina/fenilalanina (L/F) en el 141, arginina/cisteína (R/C) en el 151, arginina/histidina (R/H) en el 154, glutamina/arginina/histidina/lisina (Q/R/H/K) en el 171, asparagina/lisina (N/K) en el 176 y arginina/glutamina (R/Q) en el 211.

Se conoce desde hace tiempo que la incidencia del *scrapie* natural en ovinos está asociada a polimorfismos en el gen PrP, y particularmente aquellos que se producen en los codones 136, 154 y 171 de la ORF de dicho gen. En las primeras publicaciones concernientes al efecto del polimorfismo del locus PrP sobre el *scrapie* natural, las variaciones se estudiaron independientemente codón a codón. Así, se ha observado que en las razas polimórficas para el codón 136, los animales VV136 resultan siempre muy susceptibles al *scrapie*, mientras que los heterocigotos AV presentan una sensibilidad reducida (GOLDMAN *et al.*, 1994). En las razas, Cheviot (HUNTER *et al.*, 1996; HUNTER 1996, 1997), Ile de France (LAPLANCHE *et al.*, 1993b), Flemish y Swifter (BOSSERS *et al.*, 1996) los animales AA136 nunca se ven afectados por el *scrapie*, mientras que en otras, Swaledale (HUNTER *et al.*, 1993; HUNTER, 1993), Texel (BELT *et al.*, 1995), Lacaune (LAPLANCHE *et al.*, 1993a, CLOUSCARD *et al.*, 1995) y Romanov (CLOUSCARD *et al*, 1995), algunos animales sucumben a la enfermedad. El polimorfismo 171 está claramente ligado a variaciones en susceptibilidad al *scrapie*. Los homocigotos RR171 de todas estas razas son generalmente los más resistentes, con la excepción de un solo animal de raza Suffolk en Japón (IKEDA *et al.*, 1995). En algunas razas como Cheviot (HUNTER *et al.*, 1996), American Suffolk (WESTAWAY *et al.*, 1994) y Lacaune y Romanov (CLOUSCARD *et al.*, 1995, ELSEN *et al.*, 1999), el alelo que codifica el aminoácido R en la posición 171 es dominante sobre las alternativas Q171 y H171, siendo los animales heterocigotos RX171 totalmente resistentes. Sin embargo, algunos animales heterocigotos RX171 desarrollan el *scrapie* en razas como Scottish Suffolk (HUNTER *et al.*, 1997), Texel (BELT *et al.*, 1995) e Ile de France (LAPLANCHE *et al.*, 1993b). La información sobre el codón 154 es escasa pero indica resistencia para el alelo que codifica para el aminoácido histidina en esta posición frente al que codifica para arginina (HUNTER *et al.*, 1996, 1997; CLOUSCARD *et al.*, 1995; ELSEN *et al.*, 1999; BELT *et al.*, 1995; LAPLANCHE *et al.*, 1993a).

De hecho, la variabilidad de la sensibilidad al *scrapie* está relacionada con el polimorfismo global de estos tres codones considerados simultáneamente. De las 12 posibles combinaciones de los tres codones, 136 (T/A/V), 154 (R/H) y 171 (Q/R/H/K), el alelo salvaje es probablemente el ARQ (A136R154Q171) y los seis alelos mutantes detectados hasta ahora (TRQ, VRQ, AHQ, ARH, ARR y ARK), pueden ser el resultado

de la variación en uno de estos tres codones del alelo salvaje. El panorama general es que la susceptibilidad al *scrapie* la confiere el alelo VRQ y la resistencia los alelos ARR y AHQ, con una situación intermedia para los alelos ARQ y ARH. La variación en estos codones también afecta a la eficiencia de conversión "in vitro" de la proteína PrP a la forma de PrP asociada al *scrapie*, lo que refleja su ligamiento con la susceptibilidad a esta enfermedad. Los alelos TRQ y ARK son raros y por tanto aportan poca información en cuanto a su influencia sobre la susceptibilidad al *scrapie*. Los alelos extremos VRQ, AHQ y ARR son dominantes sobre los intermedios, encontrándose una susceptibilidad reducida en los heterocigotos VRQ/ARQ y VRQ/ARH comparada con la del homocigoto VRQ/VRQ (ELSEN *et al.*, 1999). Sin embargo, se han encontrado situaciones diferentes en distintas razas en cuanto al comportamiento de los heterocigotos VRQ/ARQ. En el estudio del rebaño de la raza Romanov del INRA (ELSEN *et al.*, 1999), se ha encontrado codominancia en el heterocigoto VRQ/ARQ, y susceptibilidad al *scrapie*, coincidiendo con los resultados encontrados en las razas Swaledale (HUNTER, 1993; HUNTER *et al.*, 1993), Texel (BELT *et al.*, 1995) y Lacaune (CLOUSCARD *et al.*, 1995; LAPLANCHE *et al.*, 1993a) y en contraposición a los de las razas Cheviot (HUNTER, 1996; HUNTER *et al.*, 1996), Ile de France (LAPLANCHE *et al.*, 1993b), Flemish y Swifter (BOSSERS *et al.*, 1996). La relación de dominancia entre los alelos asociados a la resistencia (ARR y AHQ) y a la susceptibilidad (VRQ) es variable, pero la mayoría de los animales con genotipos VRQ/ARR y VRQ/AHQ son resistentes al *scrapie*.

En razas ovinas españolas, sólo se han estudiado las frecuencias génicas y genotípicas para los codones 136, 154 y 171 del gen de la PrP en la raza Latxa con sus dos variedades Cara Rubia y Cara Negra (SANZ-PARRA *et al.*, 2001). En este estudio, se pone de manifiesto la presencia del alelo VRQ, asociado a alta susceptibilidad, a baja frecuencia en estas poblaciones y una mayor frecuencia del alelo ARR, asociado a resistencia a *scrapie*. El alelo más frecuente fue el ARQ.

La selección de animales portadores de los alelos ARR o AHQ parece ser una posible vía para mejorar la resistencia al *scrapie* natural. Sin embargo, hoy se sabe que el propio agente causante del *scrapie* es polimórfico en sí mismo (HUNTER *et al.*, 1996), demostrándose, mediante infecciones artificiales con dicho agente, la existencia de interacciones entre el genotipo del huésped y las distintas "líneas" coexistentes de *scrapie*, de modo que animales de un determinado genotipo para PrP son susceptibles a algunas líneas de *scrapie* y resistentes a otras (FOSTER y DICKINSON, 1988; GOLDMANN *et al.*, 1994; IKEDA *et al.* 1995). El homocigoto RR171 también ha sido descrito como resistente a la EEB inducida experimentalmente (GOLDMANN *et al.*, 1994). Por otro lado, los animales portadores de genotipos resistentes al *scrapie*, podrían actuar como portadores sanos difusores del agente patógeno, pero afortunadamente, los resultados obtenidos en Francia (ELSEN *et al.*, 1999), aportan un argumento en contra de la infectividad de animales portadores genéticamente resistentes, ya que animales nacidos de hembras sanas con genotipo resistente presentan menor riesgo de contraer la enfermedad que aquellos nacidos de hembras sanas con genotipo susceptible.

En la actualidad, existen programas prácticos de mejora de la resistencia al *scrapie* establecidos en Holanda, Francia y Gran Bretaña. En el caso de Holanda (SMITS *et al.*, 2000) se ha abordado una eliminación gradual de los alelos asociados con la mayor susceptibilidad al *scrapie*. El ejemplo Fran-

cés (SMITS *et al.*, 2000), se basa en la selección de animales portadores del alelo ARR de resistencia al *scrapie* en la raza Manech Tête Rousse. Por último, en el caso de Gran Bretaña (Departamento de Agricultura de Gran Bretaña) se aborda un esquema de selección de machos en el que se potencia el incremento de los alelos y genotipos ARR asociados con la resistencia a *scrapie* y la eliminación del alelo VRQ asociado con una alta sensibilidad a esta enfermedad.

Conclusiones

Un gran número de evidencias sugieren que una isoforma anormal de la PrP^{C}, la PrP^{Sc}, es la responsable de las EETs en un gran número de especies. En ganado bovino, no se ha establecido hasta la fecha una relación entre los polimorfismos encontrados en la ORF del gen de la PrP y la EEB, aunque existen ciertos indicios (estudios de asociación, epidemiológicos y de homología con otras especies) que fundamentarían la existencia de una base genética para la enfermedad. Por el contrario, en la especie ovina, la resistencia-susceptibilidad al *scrapie* y posiblemente a la EEB, se ha asociado al polimorfismo de los codones 136, 154 y 171, en la ORF del gen. Sin embargo, el diferente comportamiento de los heterocigotos entre las razas estudiadas sugiere la existencia de otros polimorfismos u otros genes que podrían estar involucrados en la EET de dicha especie.

Bibliografía

BAILER M., 2000. News Focus: Tracking the human fallout from 'Mad Cow Disease'. Science. 289. 1452-1453.

BELT P.B.G.M., MUILEMAN I.H., SCHREUDER B.E.C., RUITJER J. BOS-DE GIELKENS A.L.J., SMITS M.A., 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural *scrapie*. J. Gen Virol 76, 509-517.

BERR C, RICHARD F, DUFOUIL C, AMANT C. *et al.*, 1998. Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly: the EVA study. Neurology. 51, 734-737.

BOSSERS A., SCHREUDER B.E.C., MUILEMAN I.H., BELT P.B.G.M., SMITS M.A., 1996, PrP genotypes contributes to determining survival times of sheep with natural *scrapie*. J. Gen Virol 77, 2669-2673.

BROWN P., 1994, Transmissible human spongiform encephalopathy (infectious cerebral amyloidosis): la Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome and Kuru.: In Neurodegenerative diseases. Pp.839-876. Edited by D.B. Calne. Philadelphia, W.B. Saunders.

BROWN D.R., ZHANG H.M., DENISE S.K., AZ R.L., 1993, Bovine prion gene allele frequencies determined by AMFLP and RFLP analysis. Anim Biotechnol 4, 47-51.

BORCHELT D.R., SCOTT M., TARABOULOS A., STAHL N., PRUSINER S.B., 1990. *Scrapie* and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. J Cell Biol. 110, 743-52.

BUELER H., AGUZZI A., SAILER A., GREINER R.A. *et al.*, 1993, Mice devoid of PrP are resistant to *scrapie*. Cell Cambridge. 73, 1339-1347.

CASTIGLIONI B., COMINCINI S., DRISALDI B. *et al.*, 1998, Comparative mapping of the prion gene (PRNP) locus in cattle, sheep and human with PCR-generated probes. Mamma Genome. 9, 853-855.

CHIESA R., PICCARDO P., GHETTI B., HARRIS D.A., 1998, Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. Neuron. 21(6), 1339-51.

CLOUSCARD C., BEAUDRY P., ELSEN J.M., MILAN D., DUSSAUCY M., BOUNNEAU C., SCHELCHER F., CHATELAIN J., LAUNAY J.M., LAPLANCHE J.L., 1995, Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural *scrapie*. J Gen Virol 76, 2097-2101.

CUILLÉ J., CHELLE P.L., 1939, Experimental transmission of trembling to the goat. C.R. Seances Acad. Sci. 208. 1058-1050.

CUTLIP R.C., MILLER J.M., LEHMKUHL H.D., 1997, Second passage of a US *scrapie* agent in cattle. J Comp Pathol. 117, 271-275.

ELSEN J.M., AMIGUES Y., SCHELCHER F., DUCROCQ V., ANDREOLETTI O., EYCHENNE F., TIEN KHANG J.V., POIVEY J.P., LANTIER F., LAPLANCHE J.L., 1999, Genetic susceptibility and transmission factors in *scrapie*: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. Arch Virol. 144, 431-445.

FERGUSON N.M, DONNELLY C.A., WOOLHOUSE M.E.J. *et al.*, 1997, Genetic interpretation of heightened risk of BSE in offspring of affected dams. Proc. R. Soc Lond. B-Biological Sciences 264,1445-1455.

FISCHER M., RÜLICKE T., RAEBER A., SAILER A., *et al.*, 1996, Prion protein (PrP) with amino proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to *scrapie*. EMBO Journal, 16, 1255-1264.

FOSTER J.D., DICKINSON A.G., 1988, The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of *scrapie*. Vet Rec 123, 5-8.

FOSTER J.D., HOPE J., MCCONNELL I. *et al.*, 1994, Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats and mice. Ann New York Acad of Sci 724, 300-303.

GABIZON R., TARABOULOS A., 1997, Of mice and (mad) cows--transgenic mice help to understand prions. Trends Genet. 13, 264-9.

GOLDFARB L.G., BROWN P., RICHARD W. *et al.*, 1991, Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight octapeptide coding repeats in the PRNP gene. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 88, 10926-10930.

GOLDMANN W., HUNTER N., MARTIN T., DAWSON M., HOPE J., 1991, Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short G-C rich element within the protein coding exon. J Gen Virol. 72, 201-204.

GOLDMANN W., HUNTER N., SMITH G., FOSTER J., HOPE J., 1994, PrP genotype and the agent effects in *scrapie*: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of *scrapie*. J. Gen Virol. 75, 989-995.

GROBET L., VANDEVENNE S., CHARLIER C., PASTORET P.P, HANSET R., 1994, Polymorphism of the prion protein gene in Belgian cattle. Ann Med Vet. 138, 581-586.

HAGENNARS T.J., FERGUSON N.M., DONNELLY C.A., GHANI A.C., ANDERSON R.M., 2000, Feed-borne transmission and case clustering of BSE. Proc. R. Soc. Lond. B. 267, 205-215.

HILLS D., LEWIS S.A., COMINCINI S. *et al.*, 2000, Analysis of molecular factors affecting variability in BSE and *scrapie* susceptibility. 27th International Conference on Animal Genetics. July 22-26, 2000, Minessota (MN). USA. On Functional Genomics. Pp 16.

HOPE J., MANSON J., 1991, The *scrapie* fibril protein and its cellular isoform. Curr Top Microbiol Immunol. 172, 57-74.

HSIAO K.K., SCOTT M., FOSTER D., GROTH D.F., *et al.*, 1990, Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. Science. 250, 1587-1590.

HUNTER N., 1993, Genetic control of *scrapie* incidence in sheep and its relevance for Bovine Spongiform Encephalophaty in cattle. Rev. Medic. Virol 3, 195-200.

HUNTER N., 1996, Genotyping and susceptibility of sheep to *scrapie*. En: Methods in Molecular Medicine: Prion Diseases pags. 211-221. Ed. H Baker H y R M Ridley Totowa, N.J.: Humana Press Inc.

HUNTER N., 1997, Molecular biology and genetics of *scrapie* in sheep. En: The genetics of sheep, pags. 225-240. Ed. L Piper y A. Ruvinsky. Cab International.

HUNTER N., 1999, Molecular Biology and genetics of Bovine Spongiform Encephalopathy. The Genetics of Cattle. Eds: R. Fries and A. Ruvinsky. CAB International.

HUNTER N., FOSTER J.D., GOLDMANN STEAR M.J., HOPE J., BOSTOCK C., 1996, Natural *scrapie* in a closed flock of Cheviot sheep occurs in specific PrP genotypes. Arch Virol 141, 809-824.

HUNTER N., GOLDMANN W., BENSON G., FOSTER J., HOPE J., 1993, Swaledale sheep affected by natural *scrapie* differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of *scrapie*. J Gen Virol. 74, 1025-1031.

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

HUNTER N., MOORE L., HOSIE L., DINGSWALL B.D., GREIG A., 1997, Association between natural *scra-*

pie and PrP genotype flock of Suffolk sheep in Scotland. Vet Rec 140, 59-63.

IKEDA T., HORIUCHI M., ISHIGURO N., MURAMATSU Y., KAI-U'WE G.G., SHINAGAWA M., 1995. Amino acid polimorphisms of PrP with reference to onset of *scrapie* in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. J Gen Virol 76, 2577-2581.

INOUE S., TANAKA M., HORIUCHI M., ISHIGURO N., SHINAGAWA., 1997. Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between promoter and intron. J Vet Med Sci 59, 175-183.

KENNEY K., BROWN P., LITTLE B., 1995. Insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology. 45, 1428.

LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., BEAUDRY P., DUSSAUCY M., LAUNAY J.L., 1993A. French autochthonous *scrapie*d sheep without the 136 Val PrP polymorphism. Mamm Genome 4, 463-464.

LAPLANCHE J.L., CHATELAIN J., WESTAWAY D., THOMAS S., DUSSAUCY M., BRUGÈRE-PICOUX J., LAUNAY J.M., 1993B. PrP polymorphisms associated with natural *scrapie* discovered by denaturating gradient gel electrophoresis. Genomics 15, 30-37.

LEE I.Y., WESTAWAY D., SMIT A.F.A. *et al.*, 1998. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. Genome Research. 8, 1022-1037.

LÓPEZ GARCÍA F., ZAHN R., RIEK R., WUTHRICH K., 2000. NMR structure of the bovine prion protein. Proc Natl Acad USA.97, 8334-8339.

MCKENZIE D.I., COWAN C.M., MARSH R.F., AIKEN J.M., 1992. PrP gene variability in the US cattle populations. Anim Biotechnol. 3, 309-315.

NEIBERGS H.L., RYAN A.M. WOMACK J.E. SPOONER R.L., WILLIAMS J.L., 1994. Polymorphism analysis of the prion gene in BSE affected and unaffected cattle. Anim Genet 25, 313-317.

PAN K.M., BALDWIN M., NGUYEN J., GASSET M., *et al.*, 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the *scrapie* prion proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 90, 10962-6.

POULTER M., BAKER H.F., FRITH C. *et al.*, 1992. Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies. Brain. 115, 675-685.

PREMZL M., BOZIC P., GAMULIN V., 2000. PRNP octarepeat allele genotype frequencies among the modern and rare cattle breeds in Croatia. Anim Genet 31, 404-419.

PRIOLA S.A., CHESEBRO B., 1998. Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. J Biol Chem 273, 11980-11985.

PRUSINER S.B., 1993. Transgenetic investigations of prion diseases of humans and animals. Phil. Trans. Royal Soc. London. Series B, Biological Sciences. 339, 239-254.

PRUSINER S.B., 1998. The prion diseases. Brain Pathol. 8, 499-513.

PRUSINER S.B.; FÜZZI M., SCOTT M. *et al.*, 1993. Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in Bovine Spongiform Encephalopathy. J. Infect. Des. 167, 602-613.

PRUSINER S.B., MIKOLOS F., SCOTT M. *et al.*, 1993. Inmunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. J. of Infectious Diseases. 136, 602-613.

PRUSINER S.B., SCOTT M.R., FOSTER D. *et al.*, 1990. Transgenetic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in *scrapie* prion replication. Cell 63, 673-686.

RYAN A.M., WOMACK J.E., 1993. Somatic cell mapping of the bovine prion protein gene and restriction fragment length polymorphism studies in cattle sheep. Anim. Genet. 24, 23-26.

SAFAR J., 1996. The folding intermediate concept of prion protein formation. In: Prions (S.B. Prusiner Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

SANZ-PARRA A., BARANDIKA J., BELTRAN DE HEREDIA I., ARRESE F. *et al.*, 2001. Patrón de resistencia genética al *scrapie* en ganado ovino de raza Latxa. ITEA 22, 66-68.

SCHLÄPFER J., SAITBEKOVA N., GAILLARD C., DOLF G., 1999. A new allelic variant in bovine prion protein gene (PRNP) coding region. Anim. Genet. 30, 386-387.

SCHLÄPFER J., SAITBEKOVA N., KUFFER J., DOLF G., 2000. Genetic mapping of the prion protein gene (PRNP) on bovine chromosome 13. J Anim Breed 117, 211-216.

SCOTT M, FOSTER D, MIRENDA C, SERBAN D, *et al.*, 1989. Transgenic mice expressing hamster prion

protein produce species-specific *scrapie* infectivity and amyloid plaques. Cell 59, 847-857.

SCOTT M.R., SAFAR J., TELLING G., NGUYEN O., *et al.*, 1997. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 94, 14279-14284.

SMITS M.A., BARRILLET F., HARDERS F., BOSCHER M.Y., VELLEMA P., AGUERRE X., HELLINGA M., MCLEAN A.R., BAYLIS M., ELSEN J.M., 2000. Genetics of *scrapie* susceptibility and selection for resistance. 51st Ann. Meet. EAAP. August 21-24, 2000, The Hague, The Netherlands. pp. 295.

TELLING G.C., SCOTT M., MASTRIANNI J., GABIZON R., TORCHIA M., COHEN F.E., DEARMOND S.J., PRUSINER S.B., 1995, Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. Cell. 83, 79-90.

THORGEIRSDOTTIR S., SIGURDARSON S., VROMANS M.E.W., LANGEVELD J.P.M., SMITS M.A., 1999, PrP gene polymorphism and natural *scrapie* in Icelandic sheep. J. Gen Virol 80, 2527-2534.

THORISSON H.N., THORGEIRSDOTTIR S., SIGURDARSON S., GUDMUNDSSON G., PALSDOTTIR A., 1998, Two novel PrP allelic variants found in Icelandic sheep. Abs. Simp. In Prion and Lentiviral Deseases. XIX Northern Lights Neuroscience Symposium. p. 96.

VILES J.H., COHEN F.E., PRUSINER S.B., GOODIN D.B., WRIGHT P.E., DYSON H.J., 1999, Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. Proc Natl Acad Sci USA. 96, 2042-7.

VITAL C., GRAY F., VITAL A. *et al.*, 1998, Prion Encephalopathy with insertion of octapeptide repeats: the number of repeats determines the type of cerebellar deposits. Neuropathology and Applied Neurobiology. 24, 125-130.

WELLS G.A.H., SCOTT A.C., GUNNING R.F., JEFFREY M., DAWSON M., BRADLEY R., 1987, A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. Veterinary Records. 121, 419-420.

WESTAWAY D., ZUKIANI V., MIRENDA COOPER C., DA COSTA M., NEUMAN S., JENNY A.L., DETWILER L., PRUSINER S.B., 1994, Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural *scrapie*. Genes Dev 8, 959-969.

WHITTAL R.M., BALL H.L., COHEN F.E., BURLINGAME A.L., PRUSINER S.B., BALDWIN M.A., 2000, Cooper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. Protein Sci. 9, 332-343.

WILESMITH J.W., WELLS G.A.H., CRANWELL A.H., RYAN J.B.M., 1988, Bovine Spongiform Encephalopathy: epidemiological studies. Vet. Rec. 123, 638-644.

WOPFNER F., WEIDENHOFER G., SCHNEIDER R. *et al.* 1999. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrP reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. J. Mol. Biol. 289, 1163-1178.

YOSHIMOTO J., IINUMA T., ISHUGURO *et al.*, 1992, Comparative sequence analysis and expression of bovine PrP gene in mouse L-929 cells. Virus Genes 6, 343-356.

ZAHN R., LIU A., LUHRS T., RIEK R., VON SCHROETTER C., LÓPEZ GARCÍA F., BILLETER M., CALZOLAI L., WIDER G., WUTHRICH K., 2000, NMR solution structure of the human prion protein. Proc. Natl Acad Sci USA. 97, 145-150.

(Aceptado para publicación el 27 de agosto de 2001)