

## INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES ALELOS DEL CODON 222 DEL GEN PRNP EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA EN CABRAS

Pitarch J.L.<sup>1</sup>, Langeveld J.<sup>2</sup>, Bossers A.<sup>2</sup>, Marín B.<sup>1</sup>, Barillet F.<sup>3</sup>, Bouvier F.<sup>3</sup>, Monteón E.<sup>1</sup>, Bolea R.<sup>1</sup>, Monzón M.<sup>1</sup>, Hedman C.<sup>1</sup>, Hernández R.<sup>1</sup>, Garza M.C.<sup>1</sup>, Andreoletti O.<sup>4</sup>, Badiola J.J.<sup>1</sup>, Acín C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España; <sup>2</sup> Central Veterinary Institute of Wageningen UR; Netherlands; <sup>3</sup> INRA-UR 631 SAGA Castanet-Tolosan, France and UE 332, Bourges, France; <sup>4</sup> INRA, UMR 1225 IHAP; ENV Toulouse, France. jlpitarch@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

La finalidad del presente estudio es identificar el papel que determinados genotipos del gen PRNP caprino pueden jugar en la susceptibilidad o resistencia a la EEB en cabra. Debido a la significativa protección frente a scrapie asociada a la mutación del alelo 222K del gen PRNP (Acutis *et al.*, 2012, Vaccari *et al.*, 2006), se ha llevado a cabo una infección experimental en cabras para definir si ese mismo alelo confiere también resistencia frente a la EEB. Para ello se ha realizado la inoculación de EEB caprina (segundo pase) vía intracerebral a cabras homocigotas Lisina 222KK, cabras homocigotas Glutamina 222QQ y cabras heterocigotas Lisina/Glutamina 222QK.

Los objetivos de dicho experimento son: 1) investigar el efecto de los diferentes alelos del codón 222 del gen PRNP en la susceptibilidad frente a la EEB, con el fin de obtener argumentos para discutir un posible programa de selección genética en la especie caprina como herramienta de control de las EET en esta especie; 2) evaluar la posible transmisión maternal de la BSE en cabras; 3) obtener y analizar material biológico (sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado a mucosa intestinal, músculo y leche) de cabras infectadas por BSE en diferentes estados de la infección, con el fin de definir y cuantificar el riesgo de introducción de la EEB en la cadena alimentaria; y 4) caracterizar las propiedades bioquímicas de la proteína príon patológica en BSE caprina.

Todo ello nos permitirá un mayor conocimiento sobre la EEB caprina para la obtención de alimentos seguros y sanos a través de: 1) estimación del riesgo de introducción de la EEB en la cadena alimentaria a través de productos caprinos (leche y carne); 2) validación de modelos animales de la enfermedad y optimización de herramientas de diagnóstico para una pronta detección de la EEB; y 3) conocimiento básico sobre diversidad de cepas de EET y susceptibilidad de la especie caprina a la EEB.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Material:** en el estudio se han utilizado 8 cabras homocigotas QQ (5 machos y 3 hembras), dos cabras heterocigotas QK (ambos machos) y 4 cabras homocigotas KK (tres machos y una hembra). Todos ellos fueron inoculados vía intracerebral con un inóculo de EEB caprina aislado de una cabra 222QQ infectada previamente con EEB bovina en fase clínica. Además, se han utilizado un macho KK y un macho QQ como individuos control. Todos los machos fueron castrados excepto los dos controles, un macho KK y otro macho QQ inoculados.

**Genotipado:** el ADN genómico de todos los animales se extrajo a partir de muestras de sangre mediante un kit comercial (DNeasy de Quiagen) y se realizó una amplificación de la zona variable del gen PRNP mediante una PCR con cebadores específicos. A partir del producto obtenido se realizó una secuenciación directa.

**Inoculación:** se llevó a cabo mediante una pequeña incisión de la piel de la cabeza, y la subsecuente elaboración de una apertura en la conjunción de los huesos parietal y frontal utilizando un taladro con una broca de 0,5mm de diámetro. Por dicha apertura se inyectó el inóculo de EEB mediante el uso de una aguja de insulina.

**Toma de muestras:** periódicamente se les ha realizado a todos los animales: a) biopsia de recto cada tres meses con el objetivo de caracterizar la presencia espacio-temporal del depósito de la PrPsc; b) extracción de sangre cada dos meses con citrato dextrosa como anticoagulante y almacenamiento de plasma, suero y coágulo; y c) evaluación de signos clínicos compatibles con la enfermedad. Los animales en estado avanzado de la enfermedad, han sido sacrificados y se ha realizado la necropsia completa, obteniendo el

material biológico a estudio: sistema nervioso central y periférico, órganos linfoides y hematopoyéticos, tracto gastrointestinal y otros órganos y sistemas.

**Técnica inmunohistoquímica:** se ha valorado la presencia de la proteína patológica aplicando el protocolo inmunohistoquímico utilizado para la confirmación de los casos de EET (Monleón *et al.*, 2003). Concretamente, consiste en un pretratamiento por inmersión en ácido fórmico 98%, digestión con proteinasa K y autoclavado hidratado para el desenmascaramiento de los epítomos, tras el cual se incubaba durante 30 minutos a RT con el anticuerpo monoclonal específico frente a la proteína prión, L42 (R-Biopharm, Germany).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Hasta el momento, sólo los machos han sido inoculados, y todas las biopsias de recto han sido negativas para la detección de PrPsc. Sin embargo, los cinco machos homocigotos QQ para el codón 222 han presentado signos compatibles con la enfermedad, y cuatro de estos animales han sido sacrificados. Los signos clínicos aparecieron alrededor de los 15 meses después de la inoculación, y fueron comunes a todos los animales: pérdida de peso, comportamiento anómalo, cambios en la posición de las orejas, temblores y posición anómala de la cabeza, postura anormal de las extremidades delanteras, ataxia e hipermetría. En una de las cabras se observó ausencia de respuesta del reflejo de amenaza. Estos signos son similares a los observados en otros trabajos (Wood *et al.*, 1992), salvo por la ausencia de prurito en el presente experimento. La evolución de la enfermedad fue muy rápida, y los animales fueron sacrificados un mes después de la aparición de los primeros signos. Tras el sacrificio, se realizó la técnica de inmunohistoquímica en muestras de sistema nervioso y tejidos linforreticulares para la confirmación de la enfermedad, pudiendo observarse una amplia distribución y acumulación de la PrPsc por todos los tejidos.

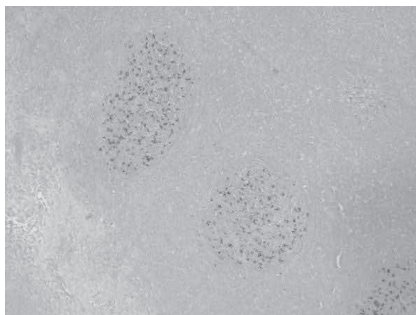
Los resultados obtenidos muestran que el genotipo del gen PRNP en cabras tiene efecto sobre la resistencia a la EEB. Los animales homocigotos Glutamina para el codón 222 (QQ) son más susceptibles a la enfermedad que los KK Lisina homocigotos o heterocigotos QK. Resultados observados en un experimento similar, pero con cepas de scrapie clásico (Acutis *et al.*, 2012) también demostraron la resistencia, frente a scrapie experimental, en cabras homocigotas KK. En el presente experimento, ninguna cabra KQ o KK han mostrado ningún signo clínico compatible con EEB. Por otro lado, el tiempo de incubación en el presente estudio ha sido de aproximadamente 15 meses, mientras que en el estudio de Acutis con scrapie fue más prolongado (19 meses). Sin embargo, aparte de las diferencias entre el scrapie y la EEB, tenemos que tener en cuenta que en este experimento la EEB se adaptó anteriormente en la especie receptora, lo que podría disminuir considerablemente el tiempo de incubación de la enfermedad. Por último, la distribución de PrPsc en el organismo ha sido muy similar en ambos estudios, así como en otros similares (Vaccari *et al.*, 2009), ya que afecta a todas las áreas del cerebro y a los tejidos linforreticulares.

Los resultados futuros proporcionarán datos sobre el posible establecimiento de un programa de cría en cabras similar al de la especie ovina (Dawson *et al.*, 2008) como una herramienta para el control de las EET en esta especie y la gestión del riesgo de introducción de la EEB en la cadena alimentaria. Además, dichos resultados permitirán la evaluación del potencial de modulación de los polimorfismos PRNP en la susceptibilidad y la patogénesis de las EET en cabras, así como la evaluación cuantitativa del riesgo de exposición humana al agente de la EEB.

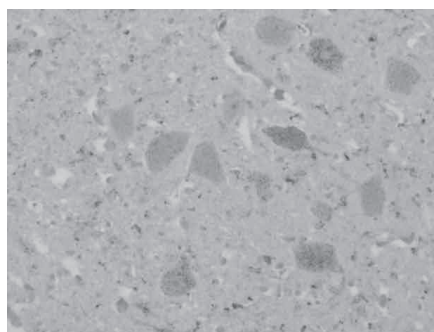
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acutis, P.L., Martucci, F., D'Angelo, A., Peletto, S., Colussi, S., Maurella, C., Porcario, C., Iulini, B., Dell'Attu, L., Zuccon, F., Corona, C., Martinelli, N., Casalone, C., Caramelli, M., Lombardi, G. 2012. *Vet. Rec.* 43:8.
- Dawson, M., Moore, R.C., Bishop, S.C. 2008. *Vet. Res.* 39:25.
- Monleón, E., Monzón, M., Hortells, P., Vargas, A., Badiola, J.J. 2003. *J Histochem Cytochem.* 51(1):15-18.
- Vaccari, G., Di Bari, M.A., Morelli, L., Nonno, R., Chiappini, B., Antonucci, G., Marcon, S., Esposito, E., Fazzi, P., Palazzini, N., Troiano, P., Petrella, A., Di Guardo, G., Agrimi, U. 2006. *J. Gen. Virol.* 87:1395-1402.
- Vaccari, G., Panagiotidis, C.H., Acin, C., Peletto, S., Barillet, F., Acutis, P., Bossers, A., Langeveld, J., van Keulen, L., Sklaviadis, T., Badiola, J.J., Andreóletti, O., Groschup, M.H., Agrimi, U., Foster, J., Goldmann, W. 2009. *Vet. Res.* 40(5):48.
- Wood, J.N., Done, S.H., Pritchard, G.C., Wooldridge, M.J. 1992. *Vet. Rec.* 131:66-68.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el proyecto goatBSE (FOOD-CT-2006-36353); por el proyecto COTSA Interreg y por el Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI). Los autores desean agradecer la colaboración del SAI, Universidad de Zaragoza; la asistencia y ayuda proporcionada por los cuidadores y técnicos del Centro de Investigación en Enfermedades Priónicas y Enfermedades Transmisibles Emergentes.



**Figura 1.** Depósito de PrPsc en tonsila (4x)



**Figura 2.** Depósito de PrPsc en médula espinal cervical (20x)

### **INFLUENCE OF THE DIFFERENT ALELES OF CODON 222 OF PRNP GENE ON SUSCEPTIBILITY TO BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN GOATS**

**ABSTRACT:** The purpose of this study is to identify the role that different genotypes of PRNP gene could play in the susceptibility or resistance to BSE in goats. An experimental work has been carried out to define if the allele 222K of PRNP gene confers resistance against BSE, inoculating it intracerebrally to homozygous KK goats for codon 222, to homozygous QQ goats, and to heterozygous QK goats. All animals homozygous QQ have had signs compatible with BSE, and four of them have been slaughtered. Clinical signs have appeared about 15 months post-inoculation, and were common to all animals: weight loss, abnormal behavior, head tremors, head twisting, ataxia and hypermetria. The evolution of the illness was fast, and the animals were slaughtered barely a month later. Genotype of PRNP gene in goats has demonstrated an effect on the resistance to clinical BSE development. Those animals homozygous QQ for codon 222 have demonstrated more susceptibility to the disease than those homozygous KK or heterozygous QK. Future results will provide data for the possible establishment of a breeding program in goats as a tool for control of TSEs in this species and the management of the risk of introducing BSE into the food chain.

**Keywords:** BSE, goat PRNP, resistance, food safety.