

## **PRIONES Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

**JOSÉ D. MÉNDEZ**

*División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Facultad de Odontología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F*

**HECTOR G. RAMOS RODRÍGUEZ**

*División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Medicina.  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Xochimilco, México, D.F*

I. Introducción .....	116
II. Epidemiología .....	117
III. Biología molecular .....	118
IV. Consideraciones genéticas .....	123
V. Neuropatología .....	126
VI. Perspectivas terapéuticas .....	130
Referencias .....	142

## I. Introducción

El scrapie es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central de ovinos y caprinos causada por priones y caracterizada por irritabilidad y prurito intenso, debido a ello los animales mordisquean su lana o pelo (1,3), de aquí surge el término de scrapie (4). Se observa en ellos incoordinación y ataxia, signos típicos de síndrome cerebelar (5). En ratones inoculados se presenta temblor generalizado, ataxia, dificultad para incorporarse desde la posición supina y rigidez de la cola (6). En el hamster otra característica es la fascies boba (7). La enfermedad se presenta meses o aun años después de la inoculación o exposición natural (de dos meses a dos décadas) (5,6,8). Es transmisible a roedores de laboratorio (9), siendo el hamster el modelo experimental preferido debido a que presenta el periodo de incubación mas corto (10,11).

En 1954 Sigurdsson sugirió que el scrapie y la enfermedad de visna, que afectan a los ovinos, eran causadas por virus lentos, con periodos de incubación o latencia prolongados y seguidos por un cuadro clínico neurológico progresivo. Hoy día se sabe que la etiología de la enfermedad de visna es un retrovirus de la Subfamilia Lentivirinae, similar al responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (12,13).

Se sabe que los priones son responsables de cuatro enfermedades humanas: la de kuru, la de Creutzfeldt-Jakob (CJD), el síndrome de Gerstmann Straüssler-Scheinker (8,9,14) y el insomnio familiar fatal (13,15), algunas transmisibles a los animales de experimentación. Las dos primeras pueden ser estudiadas en simios y monos (12). Al igual que en el scrapie, los pacientes permanecen afebriles y no presentan respuesta inflamatoria a pesar de lo abrumador y fatal de la infección (Cuadros 1 y 2) (5,16,17). Otras enfermedades son la encefalopatía transmisible del mink,

la enfermedad emaciante crónica del venado y el alce, la encefalopatía espongiiforme felina y la encefalopatía espongiiforme de los bovinos (12,13). Esta última llamada también "enfermedad de las vacas locas" (*mad cow disease*) y descubierta en Gran Bretaña en 1986, donde murieron más de 28 500 animales que presentaron incoordinación y aprensión. El posible mecanismo de transmisión fue un alimento suplementado con carne y hueso de ovinos infectados (4,11).

## II. Epidemiología

El scrapie y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob son de distribución mundial, con pocas excepciones. Australia y Nueva Zelanda proclaman haber erradicado el scrapie en ovinos y caprinos. En contraste, la enfermedad de kuru está confinada a la región Fore de la isla oriental Providencia en Papua-Nueva Guinea, aunque también la padecen algunas tribus circunvecinas. Estudios iniciales sobre la epidemiología de este padecimiento sugerían una fuerte influencia familiar. De hecho, la hipótesis primaria suponía un defecto genético. Posteriormente se determinó su asociación con rituales de canibalismo en los que únicamente participaban los miembros de una familia, quienes desarrollaban la enfermedad después de periodos de incubación que sobrepasaban las dos décadas. El cese de la incidencia se registra a partir de 1960, cuando la antropofagia termina (5,13).

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob afecta a uno en un millón de personas, mientras que la de Alzheimer es cinco mil veces más común. Ambas manifiestan disminución en el metabolismo de la 2-desoxiglucosa (14). Aunque se registran pocos casos de la CJD por inoculación directa durante la aplicación de inyecciones de hormona del crecimiento humana, trasplantes de córneas e implantación de electrodos cerebrales, la mayoría de

los casos parecen ser espontáneos (4,12). El primer caso de transmisión de persona a persona se informó en 1974 (13).

### **III. Biología molecular**

Los priones son partículas proteínicas pequeñas e infecciosas que resisten la inactivación por procedimientos que modifican los ácidos nucleicos. Sus propiedades fisicoquímicas los hacen resistentes a las radiaciones ionizantes y ultravioleta (UV) (11,18). El prion del scrapie presenta cambios significativos en su infectividad cuando recibe dosis de rayos UV mayores de  $12000 \text{ J/m}^2$ . Se sabe que  $180\,000 \text{ J/m}^2$  en longitudes de onda de 254, 267 y 280 nm, afectan 99% de su capacidad infectante. Estos datos demuestran que es altamente resistente a la irradiación UV y que se comporta más como proteína pura que como virus o viroide (Cuadro 3) (19).

Se calcula su peso molecular 50 000 daltons. Son resistentes al calentamiento (18), pues se requieren temperaturas de  $90^\circ\text{C}$  para inactivarlos. Estudios sobre los priones que causan las enfermedades de kuru y Creutzfeldt-Jakob demuestran que, al igual que el del scrapie, son extremadamente resistentes a la inactivación por radiación ionizante, lo que sugiere pueden ser semejantes en composición y tamaño (5). Los priones del scrapie y la CJD poseen casi la misma resistencia a temperatura de  $80^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. No obstante, son inactivados por bases fuertes, cloro, fenol y glutaraldehído. Resisten la acción de las proteasas y tienen distinta capacidad antigénica (Cuadro 4) (18). El prion del scrapie es resistente a varios psoralenos, a la hidroxilamina, a ciertos desinfectantes y a los detergentes (5,10). Su infectividad se altera bajo condiciones alcalinas a pH 11 y la ultraestructura de los bastones se modifica a pH 10 (20). Aun en modelos experimentales como el ratón y el hamster, la titulación completa toma de 200 a

300 días (1,16,17) debido a que su replicación es lenta y tarda muchas semanas para que aparezcan las manifestaciones clínicas (Cuadro 5) (2).

Por el hecho de no provocar la formación de partículas semejantes a virus en el tejido infectado y dadas sus características distintivas, se pensó en la hipótesis de que su estructura molecular era similar a la de los viroides descubiertos en las plantas. Sin embargo, estudios recientes demuestran que las propiedades de los viroides son totalmente distintas a las del prion del scrapie (Cuadro 6) (2,5,8).

Los priones no crecen en cultivos celulares. Son por lo menos 100 veces más pequeños que cualquier virus conocido, lo que corresponde a la tercera parte de un virino y mucho más pequeño que una molécula de albúmina (2), característica comprobada con estudios de sedimentación en gradientes de sacarosa, cromatografía y filtración a través de membranas (21). Debido a sus propiedades de replicación, variación de cepas y mutación, es posible que algún tipo de ácido nucleico, DNA o RNA, se encuentre cubierto por una nucleoproteína que impide su reconocimiento (1,9,16).

En 1982 Prusiner propuso el término *prion* (19), cuya pronunciación correcta es "preon" (4) y deriva de los vocablos proteináceo e infeccioso (5,13). Debido a sus características especiales, prion tiene una definición operacional: son partículas proteináceas pequeñas, las cuales resisten la inactivación por procedimientos que modifican los ácidos nucleicos (12). Los mejor estudiados son los aislados de cerebros de hamsters infectados por inoculación con el prion del scrapie (22).

Contienen una proteína hidrófoba esencial, misma que les confiere su heterogeneidad (5,8,16) para expresar su capacidad infectante, pero sin evidencia de ácidos nucleicos (3,15,18). Esta sialoglicoproteína se conoce como PrP (de *prion protein*) y se

denomina PrP 27-30<sup>sc</sup> si se deriva de la infección del scrapie (Cuadro 7) (4,23). La hidrólisis o modificación química selectiva da como resultado la pérdida de la infectividad del agente del scrapie (9,14,21). Las isoformas PrP celular y PrP prion poseen oligosacáridos ligados al extremo N-terminal y pueden ser removidos por digestión con N-glucosidasa. Estas moléculas pueden ser glucosiladas en dos sitios potenciales que contienen la secuencia de aminoácidos asparagina-X-treonina. No hay evidencia de la unión de azúcares al átomo de oxígeno. Las isoformas maduras tienen dos residuos de cisteína ligados por un puente disulfuro intramolecular (11,12).

La PrP 27-30 deriva de una proteína mayor, la PrP 33-35<sup>sc</sup> (22,24). Las células del cerebro de hamster sano e infectado con scrapie contienen la isoforma PrP 33-35, la cual se designa como PrP 33-35<sup>c</sup> en animales sanos (22). La PrP 27-30 o su precursor la PrP<sup>sc</sup> no se encuentra en éstos (12). La PrP se sintetiza en el retículo endoplásmico, se modifica en el aparato de Golgi y es transportada hacia la superficie de la célula donde se une al glucofosfatidil inositol (15). El hecho de encontrar PrP 33-35<sup>c</sup> en células no infectadas indica que puede estar involucrada en el metabolismo celular normal y que una fracción es convertida por un mecanismo desconocido a la forma resistente a las proteasas PrP 33-35<sup>sc</sup> (scrapie) durante el curso de la infección (Cuadro 8) (25,26).

La concentración de PrP 33-35, que es la suma de PrP 33-35<sup>c</sup> mas PrP 33-35<sup>sc</sup>, se incrementa de 5 a 10 veces después de 60 días de la inoculación intracerebral, comparada con la del tejido no infectado (27). La PrP 33-35<sup>c</sup> y la PrP 33-35<sup>sc</sup> tienen la capacidad de unir la bicapa de la membrana. En contraste con la PrP 33-35<sup>c</sup>, la PrP 33-35<sup>sc</sup> se comporta igual que una proteína anfipática, lo cual explica su asociación y posible integración a las membranas y a los bastones. Esto sugiere que la degeneración neuronal no ocurre debido a la disminución en los niveles de PrP

33-35<sup>C</sup>, sino a la acumulación de PrP 33-35<sup>Sc</sup>, la cual puede actuar como pivote en la patogénesis de la enfermedad (27).

La cadena de aminoácidos que conforman la PrP humana se dedujo de un cDNA (clonado) secuenciado y alineado con la estructura del DNA del hamster, las cuales difieren en longitud por un aminoácido (253 vs. 254) (12). La PrP de bovino y ovino solamente en siete. En contraste, la diferencia entre la PrP de humano y la de bovino es grande, en más de 30 aminoácidos. La del hombre y el ratón difieren en 28 residuos (4). La proteína del prion del hamster es un polipéptido de 254 aminoácidos y sus 22 residuos del extrema N-terminal constituyen el péptido de señalización (Cuadro 9). Los primeros 67 aminoácidos de la PrP<sup>Sc</sup> madura no se encuentran en la PrP 27-30 y contienen secuencias repetidas ricas en glicina (12). La región que inicia la lectura para la codificación de esta proteína está contenida dentro de un solo exón. El extremo final 5' del gene PrP contiene múltiples sitios de inicio ricos en guanina y citosina. Un intrón de aproximadamente 10 mil pares de bases separa al exón I del exón II (12).

La hibridación celular *in situ* en cerebros de hamsteres sanos e infectados con scrapie ha mostrado que las neuronas contienen los niveles más elevados de PrP mRNA (aproximadamente 50 copias por célula). Las células gliales poseen menos de 3 copias por célula. Mckinley encontró que la expresión del gene PrP está regulada por la tasa de crecimiento del individuo. Durante los primeros 20 días de vida, la PrP mRNA se incrementa a diferentes velocidades en varias regiones del cerebro. En el septum, la cinética del aumento es paralela a la de la colina acetiltransferasa. Ambas son estimuladas por inyecciones intraventriculares de factor de crecimiento nervioso (12). Utilizando clones de DNA se observa que la PrP 27-30 es codificada en el hamster por un gene celular simple. El mRNA se expresa en cerebro normal e infectado con scrapie a niveles similares y, en menor grado, en otros órganos de animales sanos (25). Su título es más elevado en

el cerebro y los cambios patológicos están confinados a este tejido (20). Algunos estudios in forman que la proteína PrP, en contraste con las proteínas virales, se codifica dentro del genoma del hospedero y no dentro de las partículas infecciosas (28).

La producción de anticuerpos murinos (ratones BALB/c) contra la PrP 27-30 se alcanza después de utilizar dosis inmunógenas de 50 a 75 mcg (con PrP 27-30 purificada en gel o purificada y desnaturalizada). Títulos de antisuero 16 000 se detectan por medio de la prueba de ELISA utilizando 250 ng de proteína purificada. El hecho de requerir concentraciones elevadas del antígeno purificado sugiere algún nivel de inmunosupresión innata o tolerancia a las proteínas del prion, condición evidente en roedores de experimentación. La identificación de la isoforma celular PrP 33-35<sup>c</sup> puede explicar tal fenómeno (24). De hecho, la producción de anticuerpos contra la PrP del scrapie del hamster es útil cuando se inyectan cantidades grandes del inmunógeno en conejos (14). En suma, los priones convierten proteínas normales en dañinas simplemente por inducción de moléculas inocuas para cambiar su conformación (4).

La propagación de la PrP<sup>Sc</sup> en las neuronas del cerebro ocurre debido quizá a un efecto "dominó" sobre algunas membranas internas. La hipótesis es que el proceso inicia cuando una molécula de PrP<sup>Sc</sup> hace contacto con otra de PrP normal e induce la conformación del prion del scrapie. Después, estas partículas atacan a otras moléculas de PrP normales y así sucesivamente hasta que se acumulan niveles dañinos de PrP del scrapie en los lisosomas (4,24).

La estructura primaria de la proteína normal consta de hélices alfa, regiones en las que la molécula es susceptible de sufrir un giro y determinar un género específico en forma de espiral. La forma Prp<sup>Sc</sup> contiene estructuras beta, totalmente extendidas. Algunos estudios refuerzan la hipótesis de que la Prp<sup>Sc</sup> puede

inducir la síntesis de moléculas alfa como *switch* para dar origen a moléculas beta. Se piensa que las mutaciones en el gene PrP convierte a las proteínas en susceptibles de virar de la forma alfa a la beta (4,26). La Prp<sup>c</sup> contiene un porcentaje elevado de hélices alfa (42%) y mucho menor de beta (3%), mientras que en la Prp<sup>sc</sup> es de 30% para las alfa y 43% para las beta (15).

Las proteínas de los priones de las enfermedades del scrapie y de Creutzfeldt-Jakob se identifican únicamente en tejidos de animales y humanos que cursan con enfermedades neuro-degenerativas transmisibles y no en aquellos con padecimientos como la amiloidosis sistémica murina, Alzheimer, encefalopatía anóxica o desórdenes no neurológicos (12).

#### **IV: Consideraciones genéticas**

Se ha estudiado el locus que controla los periodos de incubación del scrapie en borregos y ratones (5). Investigaciones con diferentes razas de ovinos infectados de manera natural, han establecido claramente que el componente genético del hospedero es muy importante en el curso de la enfermedad. Datos obtenidos en ovejas Cheviot inoculadas con aislados de scrapie ejemplifican el control de un gene simple sobre el periodo de incubación (6).

En borregos, los alelos se denominan SIP (periodo de incubación corto) y LIP (periodo de incubación largo). En dos grupos de ovinos Cheviot, la incidencia se incrementó en el hato seleccionado para la inoculación subcutánea. De acuerdo con la vía de administración, intracerebral o subcutánea, de la cepa SSBP/1 de scrapie los animales presentan un periodo de incubación corto ( $197 \pm 7$  días) y otro largo ( $917 \pm 90$  días), respectivamente. después del apareamiento, se observó que la acción del alelo LIP puede restringir la replicación de ciertas cepas del prion (5). Otros estudios muestran que después de un periodo de incubación de

24 meses, la enfermedad se presenta en 78% de animales Herdwicks, 72% en Dalesbreds y 0% en Dorset Downs. No obstante, resultados posteriores indican que los últimos no son resistentes, sino que el periodo de incubación es mayor que en los demás.

En el ratón se conocen dos o tres locus. El primero se denomina SINC (incubación del scrapie) y el segundo se relaciona tanto con el scrapie como con la CJD y se conoce como PID-1 (determinante del periodo de incubación del prion). El tercero parece estar ligado al sexo. De manera similar que en los ovinos Cheviot, se ha definido un gene autosómico recesivo simple con dos alelos de acuerdo con la respuesta a la inoculación de la cepa ME-7 del prion del scrapie. Los alelos se conocen como "s7" que induce periodos de incubación cortos y "p7" con periodos prolongados. Los ratones consanguíneos presentan alelo "s7", excepto el ratón VM que tiene el "p7". La generación F1 producto del apareamiento entre homocigotos "s7" y "p7" exhiben sobredominancia cuando se inoculan con la cepa 104-A, en los que el periodo de incubación excede el más largo con respecto a sus parientes, probablemente debido al gene SINC (5).

Ratones VM parcialmente consanguíneos inoculados con la cepa ME-7 presentan un periodo de incubación de 280 días, comparado con el de otras ocho cepas de ratones entre 140 y 180 días. El alelo VM se designa como SINCp7. El periodo de incubación en heterocigotos s7/p7 es intermedio. El gene PID-1 esta ligado a la región D del complejo mayor de histocompatibilidad (H-2) e influye en el periodo de incubación. Ratones con el alelo H-2 tienen periodos de aproximadamente 100 días cuando se les induce CJD experimentalmente, comparado con 130 a 170 días en otros animales H-2 congénicos (6).

Los ratones NZW/LacJ son H-2<sup>z</sup> y los I/LnJ son H-2<sup>j</sup>. Los primeros son albinos (6). Para el alelo NZW homocigoto el periodo

de incubación es corto, mientras que el periodo largo esta controlado por ambos alelos, I/LnJ y NZW. El promedio es de 150 días. Para el genotipo Prn-i se determinó un límite de 150 días entre los periodos largo (Prn-J<sup>i</sup>) y corto (Prn-i<sup>n</sup>) (Cuadro 10). En ratones NZW /LacJ es menor en comparación con los homocigotos retrocruzados Prn-i<sup>n</sup>/Prn-i<sup>n</sup>, lo que sugiere cierta influencia de algunos genes segregados en la población. En animales H-2 y c, no se modifica de manera significativa el periodo de incubación. En ratones I/LnJ es de 200 a 385 días para el scrapie (6, 12).

Los roedores I/LnJ inoculados intracerebralmente con 10<sup>6</sup> unidades de DI<sub>50</sub> de scrapie cepa Chandler, mueren en 200 a 300 días con y sin manifestaciones clínicas. Cuando estas se presentan, el cuadro se observa dos o tres días previos a la muerte. En otro estudio el tiempo entre la enfermedad y la muerte fue significativamente mayor en machos que en hembras I/LnJ e híbridos F1. No obstante, no hay diferencias entre los F1 (NZW x I/LnJ) y los F1 (I/LnJx NZW). Sus periodos de incubación son más prolongados que en los NZW/LacJ, sin diferencias en cuanto al sexo en los últimos (6).

El análisis del DNA de ratones revela un fragmento denominado kb Eco R1, el cual corresponde al gene PrP. También se presenta en el hamster, la rata, el borrego y la cabra. Por lo tanto, todas las especies susceptibles de padecer scrapie deben contener secuencias de este gene. El DNA de las cepas NZW e I/LnJ presentan el fragmento Eco R1 (25). El fragmento de los roedores I/LnJ es de 5.5 kb (kilobases) y el fragmento XbaI de los ratones NZW /LacJ es de 3.8 kb (6). En animales inferiores, el DNA de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* contienen secuencias relacionadas con la proteína PrP y son de 5.6 y 5.2 kb, respectivamente. *Saccharomyces cerevisiae* presenta fragmentos de 3.1 y 2.1 kb relacionados con el DNA que codifica la proteína PrP del hamster (25).

Los periodos de incubación en cepas Prn-pa de ratones *BALB/cJ*, *CBA/J*, *C3H/HeSn*, *C57BL/6J* y *SWR/J* se encuentran entre los 105 días para SJL y 142 días para CBA. Los de los animales Prn-pb cepas RIII/J, P/J Y Ma/MyJ se desconocen (6, 12).

Ratas transgénicas que expresan el gene PrP del hamster sirio, producen la proteína de esta especie. Este animal desarrolla la enfermedad 60 a 70 días después de la inoculación intracerebral con  $10^7$  unidades de DI<sub>50</sub> (3,5,8). Cuando se inoculan con priones de ratón, producen priones murinos. Por el contrario, cuando reciben priones de hamster, producen priones de la misma especie (4,22).

En ratones consanguíneos inoculados intracerebralmente con material aislado de individuos con CJD, las cepas congénicas difieren ampliamente en el periodo de incubación en función del haplotipo H-2. El efecto de este gene, llamado PID-1, es de la misma magnitud que el informado para el gene SINC. Estas observaciones evidencian la influencia del sexo sobre el periodo de incubación en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. En ratones C3H, los machos presentan periodos de incubación significativamente más cortos cuando se comparan con las hembras de la misma camada (5). De hecho, los periodos prolongados son el hallazgo cardinal del scrapie y la CJD (12).

## V. Neuropatología

Los priones inoculados por vía periférica parecen replicarse primero en las células linfoides con la subsecuente diseminación al sistema nervioso central (5,14). Se detectan títulos elevados en el tejido linfoide (ganglios y bazo) durante el curso inicial de la infección. El agente de la CJD se detecta en leucocitos de cuye y conejo, lo que indica que la vía de diseminación es linfohematógena. Los tejidos particularmente afectados son el

cerebro, la médula espinal y el ojo. Con la inoculación de  $10^7$  unidades de  $D1_{50}$  de scrapie de hamster, los animales no desarrollan manifestaciones clínicas antes de 50 días. No obstante, los títulos máximos se determinan a los 48 días en todas las regiones del cerebro y la médula espinal. A los 60 días manifiestan signos evidentes de disfunción neurológica (5). Estudios sobre canibalismo en hamsteres indican que los animales desarrollan scrapie de 110 a 135 días después de ingerir a sus congéneres infectados, sin diferencias significativas en relación con la cantidad consumida (Cuadro 11) (7).

Desde el punto de vista histopatológico se observa degeneración extensa del sistema nervioso central con pérdida neuronal en ausencia de respuesta inflamatoria (6,14,17), astrocitosis reactiva, vacuolización de neuronas y formación de placas de amiloide (5,9,16,29). En la enfermedad natural de los ovinos y caprinos la vacuolización es rara, mientras que la astrogliosis es extensa (8,14). Estos cambios varían entre las especies y sólo la proliferación astrocítica es el hallazgo constante (17). El hamster desarrolla vacuolización moderada con diseminación hacia la corteza cerebral y el hipocampo adyacente a la capa de células piramidales (7). Hay pérdida de espinas dendríticas en las enfermedades de Alzheimer, Creutzfeld-Jakob y scrapie (14).

Las alteraciones típicas del scrapie se observan en la materia gris y consisten en degeneración esponjiforme con gliosis astrocítica. Esta última es intensa en el sistema límbico incluyendo hipocampo, núcleo septal, tálamo y tallo cerebral. también en la materia blanca se presentan y se manifiestan como vacuolización extensa (20 a 40 micras de diámetro) y vacuolización fina (10 a 20 micras), asociadas con astrocitosis intensa (6). Estudios en cerebro de hamster indican que el mRNA que codifica las proteínas del prion se encuentran casi exclusivamente en las neuronas. Se distingue como estructuras en forma de gránulos plateados en las neuronas de la neocorteza, las formaciones de hipocampo (cuerno

de Ammon y giro dentado), el tálamo, los ganglios basales, el tallo cerebral y el bulbo olfatorio. Sin embargo, también se detecta PrP mRNA en células de animales sanos. La correlación entre el número de gránulos con los niveles de mRNA cerebral sugieren que hay entre 10 y 50 copias de este para la proteína PrP. La mayor cantidad de moléculas de PrP mRNA se identifica en las neuronas del giro del hipocampo, seguido por la neocorteza y las células de Purkinje del cerebelo. La cifra menor corresponde a las neuronas de la capa granular interna del cerebelo (29). Los acúmulos de priones del scrapie se presentan en mayor número en la región subependimaria de los ventrículos laterales. Estos agregados varían en tamaño, desde unas cuantas hasta 40 micras. Se localizan en los espacios extracelulares dilatados y están rodeados, por un lado por células del epéndimo y, por otro, por procesos astrocíticos que contienen filamentos gliales. En algunas zonas llenan el espacio extracelular, mientras que en otras ocupan el 50% o menos. también se identifican células de la microglía (macrófagos) en la vecindad de los agregados. Dentro de estos se observan mielina y lisosomas (30).

Se describen estructuras en forma de esferas, bastones, fibrillas y túbulos en el tejido cerebral infectado por kuru, CJD y scrapie. Los primeros hallazgos identificados por microscopía electrónica fueron partículas esféricas de 25 a 35 nm de diámetro dentro de las evaginaciones postsinápticas en cerebros de ratones infectados con scrapie. Estructuras similares se presentan en cerebros de ovinos con scrapie y, de humanos y chimpancés con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Su presencia en el hamster es controvertida (9,12). también se observan estructuras en forma de filamentos de 15 nm de diámetro, semejantes a virus, en cerebro de humanos con CJD (9,21). Es hallazgo común la presencia de subfilamentos de 4 a 6 nm de diámetro con giros helicoidales cuya periodicidad regular es de 40 a 60 nm y 100 a 200 nm. En los sitios de mayor diámetro están separados por espacios de 2 a 4 nm (23). En

extractos crudos de cerebros de roedores infectados con scrapie se observan estructuras fibrilares diferentes a las del amiloide por su morfología bien definida. La fibrillas se clasifican en tipo I y tipo II dependiendo si contienen 2 o 4 subfilamentos helicoidales, respectivamente (12,14).

Las partículas en forma de bastón que se presentan en cerebros de borrego, rata y ratón infectados con scrapie miden de 15 a 26 nm de diámetro y 60 a 75 nm de longitud, y están compuestos por proteína PrP 27-30<sup>Sc</sup> (9,20,21), lo que puede implicar una forma de presentación del prion (20,29). En fracciones purificadas, los bastones miden de 10 a 20 nm de diámetro y de 100 a 200 nm de longitud (Cuadro 12). Estructuras similares se observan en el tejido cerebral de pacientes con CJD (9,12). En algunos casos los bastones exhiben configuración helicoidal, lo que sugiere pueden estar compuestos por protofilamentos. En las fracciones que contienen bastones se detectan títulos de aproximadamente  $10^{9.5}$  unidades de  $D_{150}$  de priones (5,16,17). La concentración de la PrP es directamente proporcional al título del prion (14). Los anticuerpos contra la PrP 27-30<sup>Sc</sup> no reaccionan con los neurofilamentos, filamentos gliales, microtúbulos ni microfilamentos del tejido cerebral de individuos sanos (9,21).

Los bastones son tan grandes que pueden contener hasta 1 000 moléculas de PrP. La sonicación de estas estructuras da origen a partículas cilíndricas que miden menos de 75 nm de longitud. Bajo estas condiciones el título de los priones no se afecta, lo que indica que los bastones no son indispensables para provocar la infección (14). Su disociación sin desnaturalización da como resultado colato y fostatidilcolina. Con frecuencia, los lisosomas resultantes incrementan de 10 a 15 veces el grado de infectividad del prion del scrapie (12).

Se forman placas de amiloide en cerebros de individuos que padecen enfermedades similares al scrapie y la CJD como la de kuru y el síndrome de Gerstmann-Strallssler-Scheinker de

humanos, así como en la enfermedad emaciante crónica del venado y el alce. Es posible que estén relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (9,14,21). También se han descrito en cerebros de algunos animales de laboratorio con scrapie. Sin embargo, la formación de placas en ratones con scrapie esta influenciada tanto por el tipo del inóculo como por la cepa de los roedores (21). Estudios con microscopía de contraste sugieren que estas placas representan formas paracristalinas de los polímeros del prion (Cuadro 13) (14,28).

Por medio de estudios inmunocitoquímicos con anticuerpos contra la PrP 27-30, en cerebros de hamsteres infectados con scrapie, se detectan filamentos de aproximadamente 16 nm de diámetro (ocasionalmente 8 nm) y hasta 1 500 nm de longitud dentro de las placas de amiloide. También se observan cuerpos esféricos electrodensos de 40 a 120 nm de diámetro distribuidos entre los filamentos (12,21,30).

## **VI. Perspectivas terapéuticas**

Considerando la estructura tridimensional de la proteína PrP y si es correcto el modelo de las cuatro hélices, se podría desarrollar un fármaco que ocupe el espacio formado por estas estructuras y, de esta manera, estabilizar la molécula y prevenir su conversión hacia una proteína con características beta.

Otra opción es la terapéutica con anticuerpos para bloquear los genes que codifican las proteínas infectantes, disminuyendo la producción de proteína celular PrPC (4).

Por ahora no existen posibilidades terapéuticas para las enfermedades causadas por priones. Para el caso de los animales se procede a su aislamiento y sacrificio (4,32). En humanos el tratamiento se ha basado en el manejo sintomático del paciente.

CUADRO 1  
 ESPECIES SUSCEPTIBLES A LAS ENFERMEDADES CON  
 PRIONES\*

<i>Enfermedad</i>	<i>Hospedero natural</i>
Scrapie	Ovinos y caprinos
Encefalopatía transmisible del mink	Mink
Enfermedad emaciante crónica	Venado y alce
Kuru	Humanos
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	Humanos
Síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker	Humanos

- Terminologías alternativas: Encefalopatías espongiiformes subagudas y Enfermedades por virus lentos no convencionales.

(Referencias 5,16)

CUADRO 2  
 CARACTERÍSTICAS DE LAS ENFERMEDADES  
 CAUSADAS POR PRIONES

1. Enfermedades confinadas al sistema nervioso.
2. Periodo de incubación prolongado de meses a décadas antes del inicio del cuadro clínico.
3. Curso clínico progresivo de semanas a años que invariablemente conduce a la muerte.
4. Todas las enfermedades exhiben astrocitosis reactiva y pueden presentar . vacuolización de neuronas.
5. Los agentes infecciosos que ocasionan estas enfermedades tienen propiedades que los distinguen de los virus y los viroides.

(Referencias 5, 16)

## CUADRO 3

INACTIVACION DE VIRUS, VIROIDES, PRIONES Y  
ENZIMAS CON IRRADIACION ULTRAVIOLETA A  
LONGITUD DE ONDA DE 254 nm

<i>Partícula</i>	<i>D<sub>37</sub>(J/m<sup>2</sup>)</i>
Bacteriófagos	
T <sub>2</sub>	4
M <sub>13</sub>	6.5-9.9
S <sub>13</sub>	20
ØX174	20
Virus sarcoma Rous	150
Poliomavirus	240
Virus leucemia Friend	500
Virus leucemia murina	1400
Sitio Eco R1	5750
PSTV	4800- 5000
Fumarasa	3100
Deshidrogenasa glutámica	4800
RNAasa	11800
Priones scrapie (purificados)	17 200-22000
Priones scrapie (en 10% homogenado de cerebro)	24000
Ureasa	30000
Deshidrogenasa málica	41000

PSTV = viroide del tallo de la papa.

(Referencia 19)

**CUADRO 4**  
**COMPARACION ENTRE LAS PROPIEDADES DE LOS**  
**PRIONES DEL SCRAPIE Y LA ENFERMEDAD DE**  
**CREUTZFELD-JAKOB (CJD)**

<i>Propiedades</i>	<i>Scrapie</i>	<i>CJD</i>
Hospedero	Transmisión (+)	
Humanos	-	+
chimpancés	-	+
Monos	+	+
Cabras	+	+
Hamsteres	+	+/- <sup>a</sup>
Conejos	-	-
Ratones	+	+
Genes murinos que controlan los periodos de incubación; presencia (+)		
<b>SINC</b>	+	?
PID-1	+	+
Tamaño del prion	60-1000	S 41-1000S
Calor		
80 °C/30 minutos	-	+
100 °C/30 minutos	+	+
Sales y bases		
NaSCN (2M)	+/- <sup>b</sup>	-
NaOH (pH 11.0)	+	+
NaHC10 <sub>4</sub> (13.1 g/1)	+	+
Solventes		
Etanol	-	-
Glutaraldehído	+	
Formalina	+/- <sup>b</sup>	+/- <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Depende de la fuente del inóculo.

<sup>b</sup>Depende de las condiciones experimentales.

(Referencia 5)

CUADRO 5  
DATOS COMPARATIVOS DE LA ESTABILIDAD ENTRE  
VIROIDES Y PRIONES

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración</i>	<i>PSTV</i>	<i>Prion Scrapie</i>
RNAasa	0.1-100 ug/ml	+	-
DNAasa	100 ug/ml	-	-
Proteinasa k	100 ug/ml	-	+
Tripsina	100 ug/ml	-	+
NH <sub>2</sub> OH	0.1-0.5	+	-
Psoralenos (AMT)	10-500 ug/ml	+	-
Fenol	saturado	-	+
NaDodSO <sub>4</sub>	1-10 %	-	+
Zn <sup>+2</sup>	2mM	+	-
Urea	3-8 M	-	+
Álcalis	pH 10	(-)	+
KSCN	1M	-	+

- = sin cambios; (-) = cambios mínimos; + = inactivación

PSTV = viroide del tallo de la papa.

(Referencias 16,18)

**CUADRO 6**  
**PROPIEDADES DE VIROIDES Y PRIONES**

<i>Propiedades</i>	<i>PSTV</i>	<i>Prion Scrapie</i>
Acido nucleico	+	(*)*
Proteína	-	+
Peso molecular	127,000	=50,000
Coefficiente de sedimentación (s)	6.7	= 2*
$D_{37}^{***}$ a 254 nm ( $J/m^2$ )	5,000	42,000

\* No demostrado.

\*\* Valor calculado considerando que la densidad de la partícula es 1.05 g/cm<sup>3</sup> •

\*\*\* Dosis de luz UV que permite 37% de sobrevida de la partícula infecciosa.

PSTV = viroide de tallo de la papa.

(Referencia 18)

**CUADRO 7**  
**PROPIEDADES DE LA PROTEÍNA PrP 27-30 DEL**  
**SCRAPIE DE HAMSTER**

<i>Composición</i>	Sialoglucoproteína.
<i>Peso molecular</i>	27,000-30,000 daltones (electroforesis en gel de poliacrilamida) 19,500 daltones (HPLC).
<i>Propiedades</i>	Heterogeneidad en tamaño y carga. Resistente a proteasas en estado natural.
<i>Función biológica.</i>	Conformación natural requerida para la infectividad. Inactivación reversible por modificación química con dietilpirocarbonato .
<i>Estructura</i>	N- X <sub>n</sub> - Trp-Gly-Gln-Gly-Gly-Gly-Thr-His-Asn-Gln-Trp-Asn-Lys-Pro-Ser-Lys-; polimeriza hacia bastones.
<i>Ocurrencia</i>	Scrapie en cerebro de hamster. proteínas similares en scrapie de ratón. así como en <b>CDJ</b> de humanos, ratones y cujos.

(Referencias 21, 23)

## CUADRO 8

## PROPIEDADES DE LA PrP CELULAR Y DEL SCRAPIE EN HAMSTER

<i>Propiedad</i>	<i>PrP 33-35<sup>C</sup></i>	<i>PrP 33-35<sup>SC</sup></i>
Cerebro no infectado	Presente	Ausente
Cerebro con scrapie	Nivel s/cambio	Acúmulos
Concentración*	< 1 ug/g	10 ug/g
Priones purificados	Ausente	10 <sup>4</sup> moléculas/UDI <sub>50</sub>
Origen genético	Un gene celular	Un gene celular
mRNA	2.1 kilobases	2.1 kilobases
Localización		
Intracelular	Unida a membrana	Unida a membrana
Extracelular	Ninguna	Filamentos amiloides con placas
Extracción con detergente	Soluble	Formación de bastones de amiloide
Digestión por proteasa	Degradada	Convertida a PrP 27-30**

\* Expresada como ug de PrP por gramo de tejido cerebral.

\*\* La PrP 27-30 se deriva de la PrP 33-35<sup>SC</sup> durante la digestión con  
proteínasa K en ausencia o presencia de detergente.

(Referencia 27)

**CUADRO 9**  
**COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA PrP**  
**27-30 DEL SCRAPIE**

<i>Aminoácido</i>	<i>Residuos/molécula</i> <i>(por hidrólisis)<sup>a</sup></i>	<i>Residuos/molécula</i> <i>(a partir de DNAc)<sup>b</sup></i>
Ala	8.5	9
Arg	7.7	8
Asn	16.6	13
Asp		6
Cys	ND	2
Glu	16.7	7
Gln		10
Gly	16.1	14
His	5.2	5
Ile	5.3	4
Leu	3.9	3
Lys	9.5	8
Met	7.9	9
Phe	3.2	3
Pro	4.9	5
Ser	5.9	6
Thr	10.7	12
Trp	ND	2
Tyr	11.4	10
Val	8.5	10

<sup>a</sup> Promedio de 4 determinaciones basadas en 142 a.a. para PrP 27-30.

<sup>b</sup> Calculado de 146 a.a.; 71-224. DNA clonado.

ND = No determinado.

(Referencia 10)

CUADRO 10  
 PERIODOS DE INCUBACIÓN DEL SCRAPIE  
 EN RATONES Prn-<sup>n</sup> y Prn-<sup>i</sup>

<i>Periodo de incubación</i>			
<i>Ratones</i>	<i>n</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Muerte</i>
NZW/LacJ	20	113.2 ± 2.0	119.9 ± 2.3
I/LnJ	21	254.7 ± 13.6	264.7 ± 11.5
F1 (NZW x I/LnJ)	24	222.6 ± 2.8	233.8 ± 2.2
F1 (NZW x I/LnJ) x NZW/LacJ retrocruzados			
Prn- <sup>n</sup> /Prn- <sup>n</sup>	64	129.9 ± 1.1	137.8 ± 1.1
Hembras	34	129.6 ± 1.4	138.7 ± 1.7
Machos	30	130.2 ± 1.7	136.8 ± 1.5
H-2 <sup>h</sup> /H-2 <sup>h</sup>	32	130.0 ± 1.5	138.4 ± 1.3
H-2 <sup>h</sup> /H-2 <sup>j</sup>	32	129.7 ± 1.6	137.2 ± 1.8
Prn- <sup>n</sup> /Prn- <sup>i</sup>	66	194.8 ± 1.9	202.8 ± 1.8
Hembras	39	193.0 ± 2.1	202.1 ± 2.0
Machos	27	197.4 ± 3.4	203.8 ± 3.2
H-2 <sup>h</sup> /H-2 <sup>h</sup>	32	192.1 ± 2.7	201.6 ± 2.3
H-2 <sup>h</sup> /H-2 <sup>j</sup>	34	197.4 ± 2.7	204.0 ± 2.7

(Referencia 6)

CUADRO 11  
 PERIODO DE INCUBACIÓN Y SOBREVIVENCIA EN  
 HAMSTERES INFECTADOS AL PRACTICAR EL  
 CANIBALISMO

<i>Sanos: Infectados*</i>	<i>Periodo de incubación</i>	<i>Muerte (días)</i>
2:1	134 ± 3.1	158 ± 2.2
2:1	111 ± 1.3	143 ± 2.1
2:1	114 ± 3.8	142 ± 3.9
2:1	111 ± 1.2	138 ± 1.4
2.7:1	125 ± 3.1	153 ± 3.3
2:1	125 ± 3.8	152 ± 1.2
4:1	112 ± 7.4	136 ± 9.2
4:1	110 ± 5.9	136 ± 4.0
4:1	>300	...
4:1	>240	...
4:1	134 ± 4.4	154 ± 4.7
4:1	140 ± 0.8	172 ± 1.8

- Animales inoculados con  $10^7$  unidades de  $DI_{50}$  de priones del scrapie, 30 días antes de ser alojados con los hamsteres sanos.

(Referencia 7)

## CUADRO 12

**CARACTERÍSTICAS DE LOS BASTONES DEL SCRAPIE  
EN EL HAMSTER**

---

<i>Dimensiones</i>	10-20 nm diámetro y 100-200 nm de longitud.
<i>Morfología</i>	Bastones aplanados, sin unidad estructural, semejantes al amiloide purificado.
<i>Subestructura</i>	Ligeramente girados, sugiriendo protofilamentos. De 500-1 000 moléculas de sialoglucoproteína PrP 27-30 por bastón; N-Xn- Trp-Gly-Gln-Gly-Gly-GlyThr-His-Asn-Gln- Trp-Asn-Lys-Pro-Ser-Lys.
<i>Composición</i>	
<i>Infectividad</i>	Agregados de priones: la sonicación produce esferas de 19 nm de diámetro y bastones de 60 nm de longitud sin alteración de títulos.
<i>Histoquímica</i>	Se une al rojo congo y presenta birrefringencia verde-dorada.
<i>Ocurrencia</i>	Fraciones purificadas de scrapie de hamster y ratón), y CJD de humano, cuye y ratón.

---

(Referencias 21,23)

## CUADRO 13

## COMPARACIÓN DE ALGUNAS PROPIEDADES ENTRE LOS PRIONES Y EL AMILOIDE DE CEREBROS DE HAMSTERES INFECTADOS CON SCRAPIE

<i>Propiedades</i>	<i>Priones purificados</i>	<i>Placas amiloide</i>
Ultraestructura	Agregados hacia partículas en forma de bastón	Compuesta de filamentos con diámetro uniforme
Polisacáridos	Sialoglucoproteína PrP 27-30	Se tiñe con ácido peryódico Schiff
Congofilia	Birrefringencia verde-dorada	Birrefringencia verde-dorada
Antigenicidad	La alfa-PrP 27-30 colorea los bastones derivados del prion	La alfa-PrP 27-30 tiñe las placas y los filamentos

(Referencia 21)

### Referencias

1. Kimberlin, R.H.: Scrapie agent: prions or virinos ? *Nature* 297: 107-108, 1982.
2. Prusiner; S.B.: Prion. *Sci. Amer.* 246 (6): 4-5, 1982.
3. Bolton, D.C., McKinley, M.P. and Prusiner, S.B.:  
Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218: 1309-1310, 1982.
4. Prusiner, S.B.: The prion diseases. *Sci. Amer.* 30-37, 1995.
5. Prusiner, S.B. and Kingsbury, D.T.: Prions-infectious pathogens causing the spongiform encephalopathies. In: *CRC Critical Reviews in Clinical Neurobiology*, 1 (Issue 3): 181-200, 1985.
6. Carlson, G.A., Kingsbury, D.T., Goodman, P.A., Coleman, S., Marshall, S.T., DeArmond, S., Westaway, D. and Prusiner, S.B.: Linkage of prion protein and scrapie incubation times genes. *Cell* 46: 503-511, 1986.
7. Prusiner, S.B., Cochran, S.P. and Alpers, M.P.: Transmission of scrapie in Hamsters. *J. Infect. Dis.* 152 (5): 971-978, 1985.
8. Prusiner, S.B., Bolton, D.C., Groth, D.R, Bowman, K.A., Cochran, P. and McKinley, M.P.: Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21: 6942-6950, 1982.
9. Prusiner, S.B.: Structure and biology of scrapie prions. In: *Interrelationship Among Aging, Cancer and Differentiation*, by B. Pullman *et al.* D. Reidel Publishing Co. USA, pp. 277-287, 1985.
10. Oesch, B., Westway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B.H., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst. P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. and Weissmann, C.: A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985.

11. Prusiner., S.B.: Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522, 1991.
12. Prusiner, S.B.: Prions and neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 317: 1571-1581, 1987.
13. Méndez\_A.P., Netto, E.M. and Defendini, R.: Infectious prions or cytotoxic metabolites? *Lancet* 341: 159-161, 1993.
14. Prusiner, S.B.: Scrapie prions, brain amyloid, and senile dementia. In: Current Topics in Cellular Regulation. Volume 26. *Academic Press*. USA, pp. 79-95, 1985.
15. Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., fletterick, R.J. and Prusiner, S.B.: Structural clues to prion replication. *Science* 264: 530-531, 1994.
16. Diener, T.O.: The recognition of subviral pathogens. In: Subviral Pathogens of Plants and Animals: Viroids and Prions. *Academic Press*. USA, pp. 3-18, 1985.
17. Bendheim, P.E., Bockman, J.M., Mckinley, M.P., Kingsbury, D.T. and Prusiner, S.B.: Scrapie and Creutzfeldt Jakob disease prions proteins share physical properties and antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 997-1001, 1985.
18. Diener, T.O., Mckinley, M.P. and Prusiner, S.B.: Viroids and prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 5220-5224, 1982.
19. Kawahara, C.B., Cleaver, J.E., Diener, T.O. and Prusiner, S.B.: Purified scrapie prions resist inactivation by UV . irradiation. *J. Virol.* 61 (1): 159-166,1987.
20. McKinley, M.P., Braunfeld, M.B., Bellinger, C.G. and Prusiner, S.B.: Molecular characteristics of prions rods purified from scrapie-infected Hamster brains. *J. Infect. Dis.* 154 (1): 110-120,1986.
21. Prusiner, S.B., Barry, A.R., McKinley, M.P. De Armond, S.J. and Kingsbury, D.T.: Prion amyloids in scrapie and

- Creutzfeldt-Jakob disease. In: Amyloidosis, by Glenner, G.G., Osserman, E.F., Benditt, E.P., Calkins, E., Cohen, A.S. and Zucker, F.D. *Plenum Publishing Co.* USA, pp. 733-742, 1986.
22. Sparkes, R.J., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, Y., Heinzmann, C., Blatt, C., Prusiner, S.B. and Weiner, L.P.: Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 196: 83: 7358-7362.
  23. McKinley, M.P., Barry, R.A., Braunfeld, M.B., Prusiner, S.B. and De Armond, S.J.: Ultrastructural and immunological investigations of scrapie prions. In: *The Biological Substrates of Alzheimer's Disease. Academic Press.* USA, pp. 145-160, 1986.
  24. Barry, R.A. and Prusiner, S.B.: Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. *J. Infect. Dis.* 154 (3): 518-521, 1986.
  25. Westaway, D. and Prusiner, S.B.: Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein. *Nucleic Acids. Res.* 14 (5): 2035-2044, 1986.
  26. Weissmann, C.: The prion connection: Now in yeast? *Science*, 264: 528-530, 1994.
  27. Meyer, R.K., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Braufeld, M.B., Barry, R.A. and Prusiner, S.B.: Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2310-2314, 1986.
  28. Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R.A., De Armond, S.J. and Prusiner, S.B.: Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neural.* 20 (2): 204-208, 1986.
  29. Kretschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E. and De Armond, S.J.: Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* 122 (1): 1-5, 1986.

30. De Armond, S.J., McKinley, M.P., Barry, R.A., Braunfeld, M.B., McColloch J.R. and Prusiner, S.B.: Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* 41: 221-235, 1985.
31. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKnley, M.P., Prusiner, S.B. and Weissmann, C.: Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46 :417-428, 1986.
32. Moreno Chan, R. y Valdés Vázquez, L.M.: Nueva enfermedad de Ios bovinos: Encefalopatía espongiforme. *Ciencia Veterinaria* 6: 275-308, 1994.