



Tesis de Maestría en Biología-Subárea Genética
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Universidad de la República, Ministerio de Educación y Cultura
Montevideo, Uruguay.

“POLIMORFISMO DEL GEN *PRNP* EN DIFERENTES RAZAS BOVINAS Y SU EFECTO SOBRE CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS CÁRNICO Y EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE SU ARNm EN TONSILA PALATINA Y MEDULA ESPINAL CERVICAL”

Dr. RODY ARTIGAS SILVA

Unidad Académica de Genética y Mejora Animal
Facultad de Veterinaria-Udelar

Orientadora: Dra. Eileen Armstrong

Co-orientadora: Dra. Silvia Llambí

Co-orientadora: Dra. Paula Nicolini

Tribunal integrado por:

Predidente: Dr. Rodrigo Puentes.

Vocales: Dra. Lucía Calleros y Dra. Victoria de Brun.

“Cada trecho recorrido enriquece al peregrino y lo acerca un poco más a hacer realidad sus sueños”.

Paulo Coelho.

A mi familia y amigos, con su apoyo construyo día a día mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por acompañarme en todos los momentos de mi vida. Gracias por ser el motor que me impulsa a avanzar y alcanzar mis objetivos. No creo encontrar palabras suficientes para expresar cuanto valoro su permanente apoyo.

A mis amigos, a quienes elijo todos los días para caminar juntos en esta vida. Gracias por ser la palabra justa en los momentos más difíciles y bancarse mis ausencias durante este tiempo.

A Nani, Noe y sus preciosas familias, soy muy afortunado de contar con su amistad y confianza. Todos deberían tener una de cada una en la vida.

A mi orientadora, la Dra. Eileen Armstrong, gracias por sus aportes a este trabajo, por la confianza depositada en mí y por siempre dejarme trabajar sin mayor presión que la que uno mismo se impone. Espero haber colmado las expectativas.

A mi coorientadora la Dra. Silvia Llambí, gracias por su apoyo, no solo en esta tesis, sino que a lo largo de toda mi carrera profesional. Siempre será un grato recuerdo haber sido codirigido por tan apreciada colega. A mi otra coorientadora, la Dra. Paula Nicolini. Gracias por sus aportes y apoyo en todos los momentos en los que fue posible. Para mí significaron mucho.

A cada uno de mis compañeros de la Unidad Académica de Genética y Mejora Animal, especialmente al Lic. Eugenio Jara, que sufrió un calambre llamado Rody en varios momentos de este trabajo.

A las compañeras del Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (LEMA), especialmente a las Lics. Claudia Meneses y Victoria de Brun, por atender mis consultas técnicas y sacarme del apuro cuando se me terminaba algún reactivo.

A la Lic. Valerie Cayssials por atender con total amabilidad y paciencia mis consultas estadísticas.

A la Dra. Florencia Iglesias, una gran compañera de clases en nuestra época de estudiantes y actualmente una colega enormemente solidaria. Sin su colaboración parte de este trabajo no podría haberse realizado.

A todos, gracias, un pedacito de este logro también les pertenece.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	13
1.2. El origen y dispersión de la EEB.	15
1.3. El fenómeno de cepas en la EEB.	19
1.4. Patogenia de la cEEB.....	21
1.5. Efectos socioeconómicos de la cEEB	24
1.6. El gen <i>PRNP</i> Bovino y la PrP ^C	25
1.7. HIPÓTESIS.....	34
1.8. OBJETIVO GENERAL	34
1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
II. .POLIMORFISMOS INDEL12pb E INDEL23pb DEL GEN <i>PRNP</i> EN BOVINOS DE CUATRO RAZAS DE URUGUAY LIBRES DE ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA.....	37
RESUMEN	38
ABSTRACT.....	38
INTRODUCCIÓN	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	54
AGRADECIMIENTOS	54
LITERATURA CITADA	54
III..... DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS INDEL23pb E INDEL12pb DEL GEN <i>PRNP</i> BOVINO Y SU EFECTO SOBRE CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS CÁRNICO EN LA RAZA ABERDEEN ANGUS DE URUGUAY	60
RESUMEN	61
ABSTRACT.....	61
INTRODUCCIÓN.....	62
RESULTADOS.....	63
DISCUSIÓN	64
MATERIALES Y MÉTODOS	67
REFERENCIAS.....	74

IV. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>PRNP</i> EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO PARA LOS POLIMORFISMOS INDEL23pb E INDEL12pb EN MÉDULA ESPINAL CERVICAL Y TONSILA PALATINA EN BOVINOS SANOS	80
RESUMEN	81
ABSTRACT.....	81
INTRODUCCIÓN	82
MATERIAL Y MÉTODO	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
CONCLUSIONES	92
AGRADECIMIENTOS	92
LITERATURA CITADA	92
COMENTARIOS GENERALES	97
LITERATURA CITADA	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes histopatológicas y microscopía electrónica de lisados cerebrales de un caso de EEB	14
Figura 2. Microfotografías electrónicas de las varillas de prion asociadas a diferentes infecciones por priones.....	15
Figura 3. Utilización de solventes en la producción de HCH en Reino Unido (1964 y 1988)	16
Figura 4. Expansión de la EEB en Reino unido (1986-1996).....	17
Figura 5. Casos diagnosticados de EEB entre 1989 y 2015 en Reino Unido, la Unión Europea y el resto del mundo.....	18
Figura 6. Diferenciación de los tipos de cEEB por Western Blot.....	20
Figura 7. Proceso de neuroinvasión de los priones infecciosos luego de la exposición por vía oral.....	23
Figura 8. Esquema de la estructura del gen PRNP bovino	26
Figura 9. Estructura tridimensional de la PrP ^C recombinante bovina.	27
Figura 10. Estructura de la PrP ^C . A la izquierda PrP ^C bovina, a la derecha PrP ^C humana.....	27
Figura 11. Esquema de la estructura tridimensional de PrP ^C y PrP ^{Sc}	28

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

- aa: aminoácido
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- bHLH: hélice bucle hélice básica
- BTA13: cromosoma bovino 13
- cEEB: forma clásica de la encefalopatía espongiforme bovina
- D12: alelo de delección de 12pb
- D23: alelo de delección de 23pb
- ECJ: enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
- EEB: encefalopatía espongiforme bovina
- EETs: encefalopatías esponfiformes transmisibles
- GC: guanina-citocina
- GPI: anclaje glicosil fosfatidil inositol
- HCH: harina de carne y hueso
- H-EEB: forma atípica H de la EEB
- Indel: inserción/delección
- I12: alelo de inserción de 12pb
- I23: alelo de inserción de 23pb
- kDa: kilodálton
- L-EEB: forma atípica L de la EEB
- mpi: meses post infección
- nvECJ: nueva variante de ECJ
- pb: pares de bases
- Prion: *Proteinaceous Infectious Particle*
- *PRNP*: gen de la proteína prion
- PrP^C: forma celular de la proteína priónica
- PrP^{SC}: forma infecciosa de la proteína priónica
- RP58: proteína represora RP58
- SNC: sistema nervioso central
- SNP: polimorfismo de nucleótido simple
- SP1: proteína específica 1
- UE: Unión Europea

RESUMEN

La Encefalopatía espongiforme bovina (cEEB) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva transmisible de los bovinos, caracterizada por el acúmulo en el cerebro de una isoforma patológica (Prp^{SC}) de la proteína príon celular (Prp^{C}). Una vez ingeridos, los priones infecciosos recorren un camino de neuroinvasión centrípeta, dónde las tonsilas palatinas y las placas de Peyer son órganos claves de acopio y acumulación temprana. Una vez alcanzada la médula espinal, la PrP^{SC} se disemina hasta el encéfalo. Dos polimorfismos de inserción/delección en el gen *PRNP* (de 23pb en el promotor y de 12pb en el intrón 1) han sido asociados con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. Se ha propuesto que el aumento de la susceptibilidad puede ser producido por un aumento de la expresión de *PRNP*, al perderse en el gen sitios reguladores a causa de las delecciones. La distribución poblacional de los polimorfismos indel23pb e indel12pb se ha estudiado en pocas razas, siendo escasa la información a nivel regional. Poco se sabe del efecto de esos marcadores sobre características de interés cárnico, así como del efecto sobre los propios niveles de expresión de *PRNP* en órganos de importancia patogénica. En este trabajo analizamos los polimorfismos indel23pb e indel12pb en 214 bovinos sanos, pertenecientes a cuatro grupos raciales diferentes (Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian y Criollo Uruguayo). Se encontró una alta frecuencia de los alelos (D23 y D12) y del haplotipo de susceptibilidad (D23-D12) en los animales Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford y Holstein Friesian, mientras que el Criollo Uruguayo presentó una mayor frecuencia de los alelos (I23, I12) y del haplotipo de resistencia (I23-I12). Por otra parte, se analizaron 635 Bovinos Aberdeen Angus, de diferentes orígenes, alimentados a campo natural o *feedlot*, con registros para peso de la canal, longitud de la canal, color de la carne (L,a,b), fuerza de corte (24hs y 10 días), pérdidas por cocción (24hs y 10 días) y porcentaje intramuscular de lípidos. Los animales de *feedlot* con genotipo DD presentaban canales más largas que los II (indel23pb: $P=0.002$; indel12pb $P=0.02$). El porcentaje de grasa intramuscular fue mayor en los animales DD alimentados a pasto (indel23pb: $P=0.016$; indel12pb: $P=0.043$) y en los animales de *feedlot* (solo para indel23pb: $P=0.02$). En los animales II alimentados a pasto, para el marcador indel23pb, la fuerza de corte a los 10 días tendió a ser mayor respecto a los DD ($P=0.088$), concordante con un menor porcentaje de lípidos. Para determinar el efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb sobre los niveles de expresión de *PRNP*, se analizaron muestras de tonsila palatina y médula espinal cervical de 20 bovinos Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford. Los animales fueron agrupados según su genotipo en 5 grupos diferentes. La expresión del gen fue superior en médula espinal cervical que en tonsilas palatinas ($P<0.0001$). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de acuerdo al genotipo ($P>0.05$), aunque aumentaba en presencia de los alelos de delección en la mayoría de los casos. Este trabajo de tesis demuestra que los marcadores indel23pb e indel12pb son polimórficos en los grupos de animales analizados, indicando una mayor resistencia genética del Criollo Uruguayo a la cEEB que en las otras razas, revalorizándolo como recurso

zoogenético. Además, se encontró que los dos indels pueden afectar características de la canal y la carne y podrían ser utilizados para seleccionar animales desde un punto de vista sanitario o productivo. Sin embargo, no pudo demostrarse el efecto del gen sobre los niveles de expresión de *PRNP* en tonsila palatina o médula espinal cervical. De acuerdo a la bibliografía consultada, esta tesis es el primer reporte de asociación del gen *PRNP* con características de la carne y la canal, de los niveles de expresión de *PRNP* en tonsila palatina, así como del efecto de los indels sobre la expresión del gen en tonsila palatina y médula espinal cervical.

ABSTRACT

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) is a progressive, transmissible neurodegenerative disease of cattle characterized by the accumulation in the brain of a pathological isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^C). Once ingested, infectious prions follow a path of centripetal neuroinvasion, where the palatine tonsils and Peyer's patches are key organs for early storage and accumulation. After reaching the spinal cord, PrP^{Sc} spreads to the brain. Two insertion / deletion polymorphisms in the *PRNP* gene (23bp in the promoter and 12bp in intron 1) have been associated with resistance or susceptibility to this disease. It has been proposed that the increase in susceptibility may be produced by an increase in *PRNP* expression, as regulatory sites are lost in the gene due to these deletions. The populational distribution of the indel23pb and indel12pb polymorphisms has been studied in few breeds, with scarce information at the regional level. Little is known about the effect of these markers on meat traits of interest, as well as their effect on the *PRNP* expression levels themselves in organs of pathogenic importance. In this work we analyze the indel23pb and indel12pb polymorphisms in 214 healthy bovines, belonging to four different breed groups (Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian and Uruguayan Creole). A high frequency of the alleles (D23 and D12) and of the susceptibility haplotype (D23-D12) was found in the Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford and Holstein Friesian animals, while the Uruguayan Creole presented a higher frequency of the alleles (I23, I12) and the resistance haplotype (I23-I12). In a different trial, 635 Aberdeen Angus cattle of different origins, grass fed or from feedlots, were analyzed. These animals had records for: second scale carcass, carcass length, meat color (L, a, b), shear force (24 hours and 10 days), cooking loss (24 hours and 10 days) and intramuscular lipid percentage. Feedlot animals with DD genotype had longer carcasses than II (indel23pb: P = 0.002; indel12pb = 0.02). The percentage of intramuscular fat was higher in grass-fed DD animals (indel23pb: P = 0.016; indel12pb: P = 0.043) and in feedlot animals (only for indel23pb: P = 0.02). In grass-fed II animals, for the indel23pb marker, the shear force at 10 days tended to be higher with respect to DD (P = 0.088), consistent with a lower intramuscular lipid percentage. To determine the effect of indel23pb and indel12pb polymorphisms on PRNP expression levels, palatal tonsil and cervical spinal cord samples from 20 Aberdeen Angus and Aberdeen Angus x Hereford bovines were analyzed. The animals were grouped according to their genotype in 5 different groups. The expression of the gene was higher in the cervical spinal cord than in the palatine tonsils (P < 0.0001). No significant differences were observed in expression levels according to genotype (P > 0.05), although it was higher in the presence of deletion alleles in most cases. This thesis work shows that the indel23pb and indel12pb markers are polymorphic in the groups of animals analyzed, indicating a greater genetic resistance of the Uruguayan Creole cattle to cEEB than in the other breeds, reinforcing its value as a zoogenetic resource. In addition, it was found that the two indels can affect carcass and meat traits and could be used to select animals from a sanitary or productive point of

view. However, the effect of the polymorphism on *PRNP* expression levels in palatine tonsil or cervical spinal cord could not be demonstrated. According to the bibliography consulted, this is the first report of association of the *PRNP* gene with meat and carcass traits, of *PRNP* expression levels in palatine tonsil, as well as the effect of indels on gene expression. in palatine tonsil and cervical spinal cord.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)

La EEB es una enfermedad neurodegenerativa de los bovinos, lentamente progresiva, caracterizada por degeneración y vacuolización del tejido cerebral. Perteneció al grupo de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), junto al Scrapie de ovinos y caprinos, la Encefalopatía Espongiforme Felina, la Encefalopatía Espongiforme de los Ungulados Exóticos, la Encefalopatía Transmisible del Visón, y la Enfermedad Debilitante Crónica de ciervos y alces. Por su parte, en los humanos se han descrito hasta la fecha cinco EETs: la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ: en sus formas típica, atípica, iatrogénica y familiar), el Síndrome de Insomnio Familiar Fatal, el Kurú, el Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, y la nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (nvECJ) (Artigas, 2017).

Una de las características más remarcables de todas las EETs es su largo periodo de incubación, que puede alcanzar a varios años. La sintomatología varía poco de una enfermedad a otra, siendo constantes el deterioro motor y cognitivo, así como la ataxia cerebral. Cuando los síntomas comienzan, la evolución clínica suele ser rápida, alcanzando la muerte a los pocos meses (Aguilar-Calvo et al., 2015).

El primer caso clínico reportado de EEB se dio en Reino Unido en abril de 1985 en una vaca adulta raza Holstein Friesian perteneciente a una granja del condado de West Sussex, sur de Inglaterra (Wells et al., 1987). Ese primer caso marcaría el inicio de una epidemia animal que impondría trabas al comercio internacional de productos de la ganadería, y múltiples restricciones para la utilización de los subproductos, vigentes hasta hoy en día. Para finales de 1985 la cifra de casos en Reino Unido era de 14 animales, en 1986 de otros 60 (Pattison, 1998) y para 1992 se había alcanzado el pico de 37.000 casos sólo en ese año (Houston y Andréoletti, 2019).

Tras un largo periodo de incubación (4 a 5 años), los animales afectados se volvían aprensivos, hiperestésicos, y con incoordinación en la marcha. Los cambios en el comportamiento eran característicos, los animales que eran normalmente dóciles y fáciles de manejar, comenzaban a patear y reaccionaban bruscamente a los estímulos visuales, táctiles y auditivos. La incoordinación de la marcha se agudizaba con el tiempo con hipermetría, el comportamiento se tornaba más peligroso e impredecible. Muchas veces, los animales caían, y la muerte sobrevinía en el decúbito si no eran sacrificados antes (Wells et al., 1987). La histopatología realizada a los animales muertos, reveló la presencia de cambios degenerativos, bilaterales y simétricos, a nivel de la materia gris del tallo cerebral, observándose vacuolas en los somas neuronales y en el neuropilo, acompañadas de una discreta gliosis (ver figura 1 a y b) (Wells et al., 1987).

Los hallazgos clínicos e histopatológicos resultaron muy similares a otras EETs, principalmente al Scrapie. Apenas unos años antes de que surgiera esta nueva enfermedad neurológica de los bovinos, Stanley Prusiner propuso el término *prion* (acrónimo del inglés *Proteinaceous Infectious Particle*) para denominar al agente que producía el Scrapie en las ovejas (Prusiner, 1982).

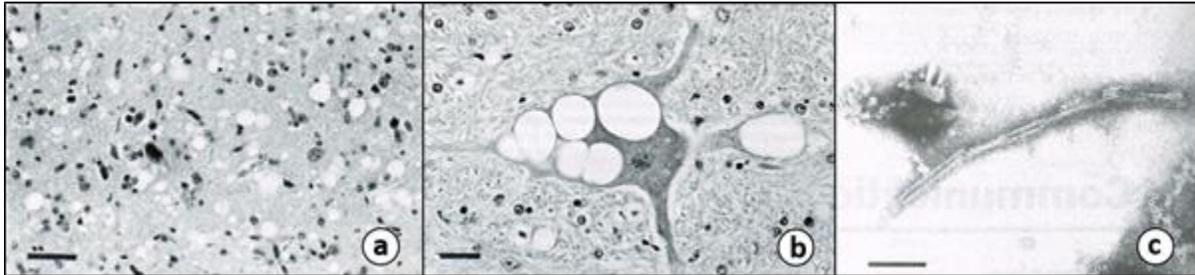


Figura 1. Imágenes histopatológicas y microscopía electrónica de lisados cerebrales de un caso de EEB. a) Sustancia gris con múltiples vacuolizaciones en neuropilo. Núcleo solitario, médula oblonga. Hematoxilina-eosina, barra = 50µm; b) Pericarión neuronal con múltiples vacuolas. Formación reticular, médula oblonga. Hematoxilina-eosina, barra = 25µm; c) Micrografía electrónica de lisado de encéfalo fresco, con fibrillas similares a las reportadas en otras EETs. Tinción negativa, barra=100nm. Tomado de Wells et al. (1987)

A inicios de los años 80` Merz et al. (1981) y Prusiner et al. (1983) publicaron la primera evidencia morfológica del agente causal del Scrapie y ECJ, mediante tinción negativa en microscopía electrónica. Estos investigadores observaron estructuras fibrilares anómalas en encéfalos de individuos afectados (figura 2), que Merz atribuyó a un tipo de virus filamentosos. Prusiner, en cambio, las atribuyó a lo que denominó varillas de prion, logrando aislar posteriormente la proteína PrP de lisados de encéfalos homogeneizados (Prusiner et al., 1983).

El aislamiento de la proteína permitió determinar que PrP^{SC} estaba codificada por un gen del huésped y que provenía de una proteína de mayor tamaño (33-35 kDa) (Oesch et al., 1985). La identificación del gen (*PRNP: Prion Protein*) y de su ARNm (ARN mensajero) no demoró en llegar, comprobándose la expresión constitutiva en diferentes órganos, incluido el cerebro. Adicionalmente, se demostró que la PrP^{SC} y la PrP descubierta en animales sanos llamada PrP^C (isoforma celular normal) eran codificadas por el mismo gen, por lo que la PrP^{SC} podría ser explicada por mecanismos de transformación postraduccionales (Basler et al., 1986).

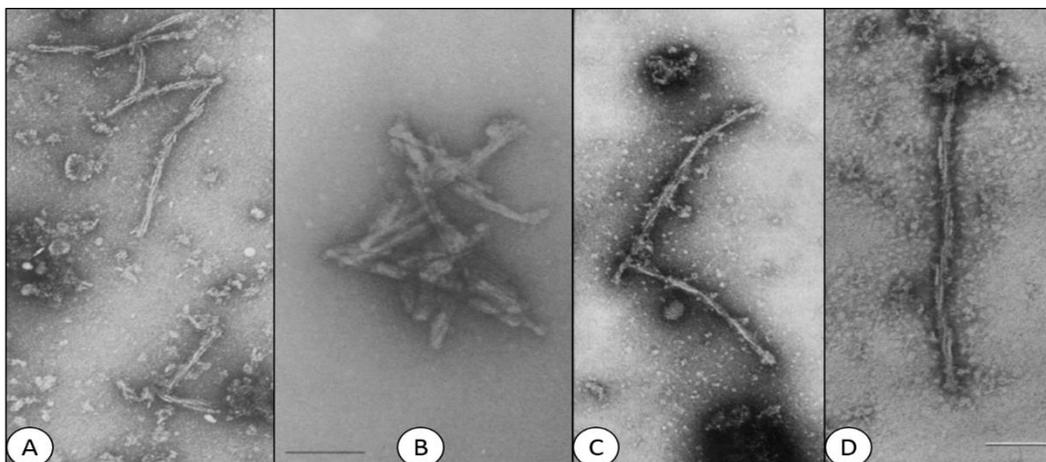


Figura 2. Microfotografías electrónicas de las varillas de prion asociadas a diferentes infecciones por priones. A) Muestra de encéfalo de ratón inoculado con cepa 139A de Scrapie. Aumento 68400X (modificado de Merz et al., 1981). B) Muestra de encéfalo de hámster inoculado con cepa de Scrapie adaptada a Hamster (modificado de Prusiner et al., 1983). C) Muestra de encéfalo de paciente humano con ECJ. Aumento 133000 y D) Muestra de encéfalo de ovino afectado por Scrapie. Aumento 133000 (modificados de Merz et al., 1983). La barra indica 100 nm. A, C y D tinción negativa con ác. fosfotungstico de sodio, B) tinción negativa con formato de uranilo.

La microscopía electrónica de lisados de cerebro de los bovinos afectados por la nueva enfermedad, revelaron la presencia de estructuras fibrilares, muy similares a las encontradas para el Scrapie (ver figura 1 c) (Wells et al., 1987). Los hallazgos clínicos, histopatológicos y la microscopía electrónica llevaron a establecer una semejanza con los casos de EETs reportados anteriormente, denominando a la enfermedad como Encefalopatía Espongiforme Bovina.

1.2. El origen y dispersión de la EEB.

El origen de la EEB aún no se conoce con exactitud, si bien se han manejado fuentes probables. Los estudios epidemiológicos realizados a finales de los años 80 mostraron que la EEB podía haber sido causada por la exposición del ganado a un agente similar al del Scrapie durante el invierno de 1981-1982. La fuente más probable era el alimento, que contenía en su composición proteína derivada de rumiantes en la forma de harina de carne y hueso (Wilesmith et al., 1988).

La harina de carne y hueso (HCH) es un subproducto elaborado a partir del “rendering” o reciclado, principalmente de los desechos de la industria frigorífica, que desde tiempos antiguos se utilizó para extraer sebo. En 1988, Inglaterra contaba con 46 plantas activas de *rendering* que, en total, procesaron 1,3 millones de toneladas de desechos frigoríficos y carcasas solo en ese año. A pesar de que no todas las plantas mantenían un registro adecuado del tipo de materia prima procesada, se estimó que el 33,4% provenía de las menudencias, 30,5% de los huesos, 15,9% del *trimming*, 8,9% de las carcasas y el 11,1% restante de otros tejidos. Al considerar la especie, la mayor parte de la materia prima era de origen bovino (44,8%),

seguido del porcino (20,9%), ovino (15,3%) y de otras especies incluidas las aves (19%). La mayoría de los tejidos eran aportados por la industria frigorífica, a excepción de las carcasas enteras, que provenían de animales que morían en las granjas (Wilesmith et al., 1991), momento en que la explotación ovina se encontraba en su apogeo y la prevalencia del Scrapie era significativa (Taylor et al., 1995).

Los solventes hidrocarbonados utilizados como un aditivo durante la cocción de los residuos, facilitaba la extracción del sebo, aumentando el rendimiento. Sin embargo, para eliminar los restos de solventes, era necesaria una tapa de calor húmedo posterior. Dada la susceptibilidad de los priones infecciosos al calor húmedo, esa etapa pudo haber sido una barrera en contra de la EEB (Wilesmith et al., 1991). A partir de 1964, se instauraron cambios tecnológicos en el proceso del *rendering*, que no implicaban la utilización de solventes, y por tanto tampoco el tratamiento térmico posterior. Esto abrió la oportunidad a que se pudieran procesar tejidos presumiblemente contaminados con el agente infeccioso, especialmente a partir de 1981. En la figura 3 se muestra el porcentaje de HCH producida en Reino Unido mediante la utilización de solventes hidrocarbonados.

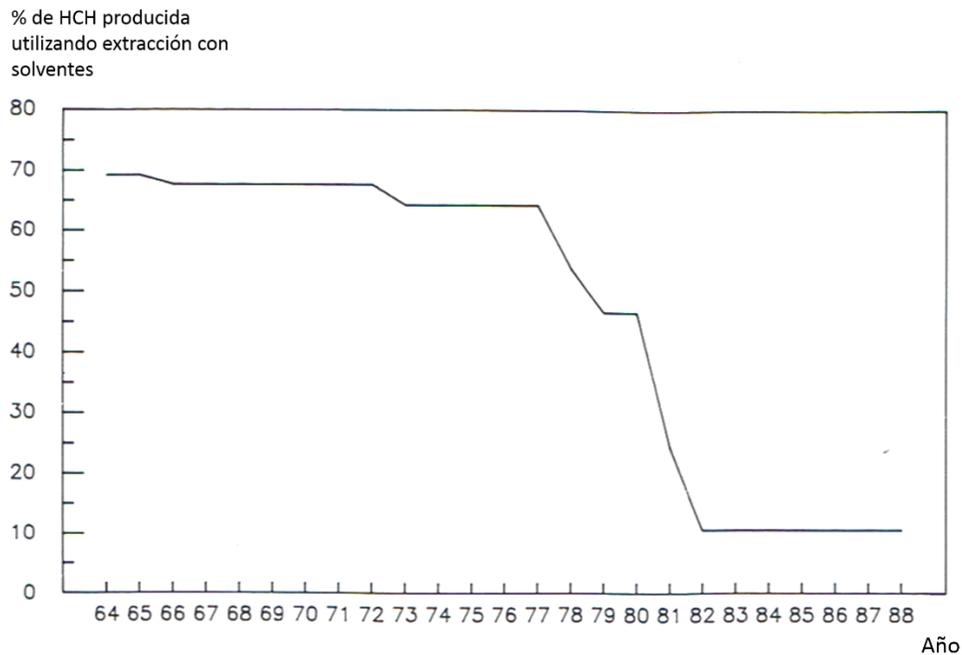


Figura 3. Utilización de solventes en la producción de HCH en Reino Unido (1964 y 1988). *Modificado de Wilesmith et al. (1988).

En función de la evidencia epidemiológica, en julio de 1988 se prohibió en Inglaterra la utilización de HCH en la alimentación de rumiantes (Hoinville et al., 1994). El producto no consumido dentro del país se exportó a la Unión Europea (UE) y de ahí a otros países, diseminando el agente por varias partes del mundo. Para el año 1994, la enfermedad se había distribuido rápidamente por todo Reino Unido (Figura 4).

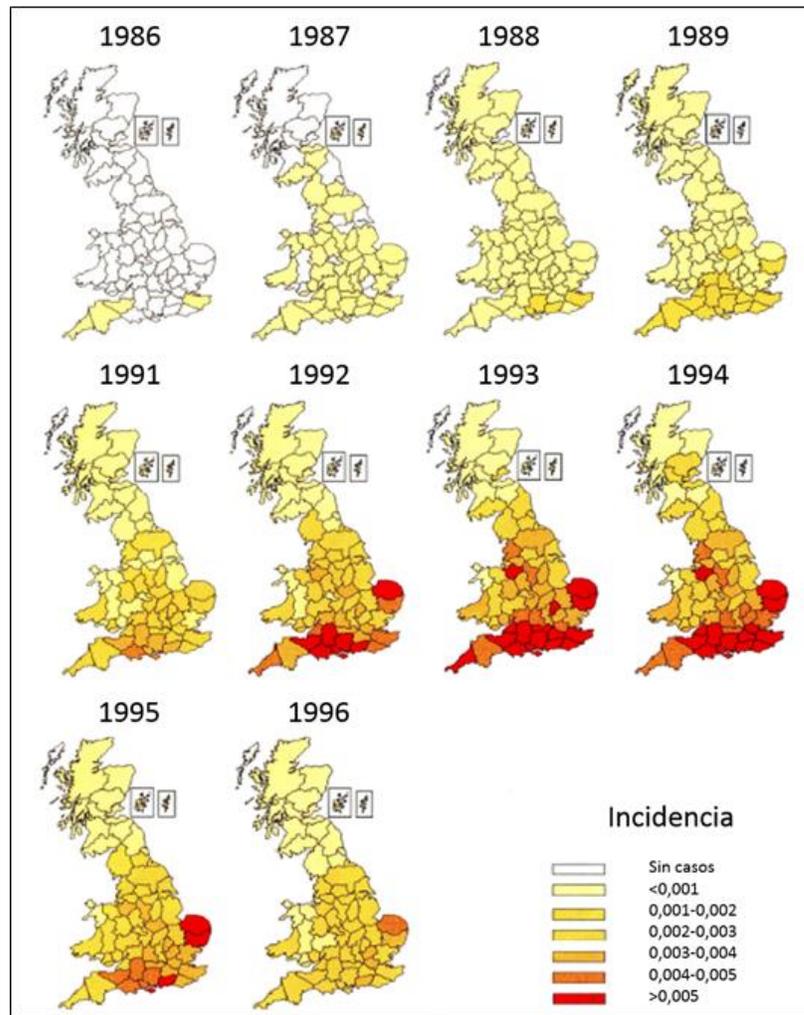


Figura 4. Expansión de la EEB en Reino Unido (1986-1996). *Modificado de Anderson et al. (1996).

Si bien no existe una susceptibilidad racial a la enfermedad, la EEB se vio ligada a las razas productoras de leche (Cassalone y Hope, 2018). Más del 60% de los rodeos lecheros del país habían presentado al menos un caso de EEB, probablemente debido a que eran suplementadas de manera más frecuente con ración (conteniendo HCH), que las razas productoras de carne (Wilesmith et al., 1998).

La prohibición del uso de HCH en la alimentación de rumiantes comenzó a surtir efecto, y desde el año 1995 los casos comenzaron a disminuir gradualmente en Reino Unido (Anderson et al., 1996). Sin embargo, se observaron casos de EEB en animales nacidos luego de la prohibición de HCH, atribuido a contaminación cruzada durante la elaboración de raciones para cerdos y aves, donde la HCH aún era permitida (Whilesmith et al., 1998, Bradley et al., 2006). Para el año 1996 la HCH había sido prohibida en

Reino Unido en la elaboración de raciones destinadas a la alimentación de animales de granja (Houston y Andréoletti, 2019).

La situación del resto del mundo iba en dirección contraria a la observada en Reino Unido (figura 5), posiblemente por la importación de animales en pie o de HCH desde aquel país (Ducrot et al., 2008). La UE se vio particularmente afectada, hasta la prohibición de la utilización de HCH en la alimentación de rumiantes en 1994 (Ducrot et al., 2008; Houston y Andréoletti, 2019) y de todos los animales de granja en 2001 (Houston y Andréoletti, 2019).

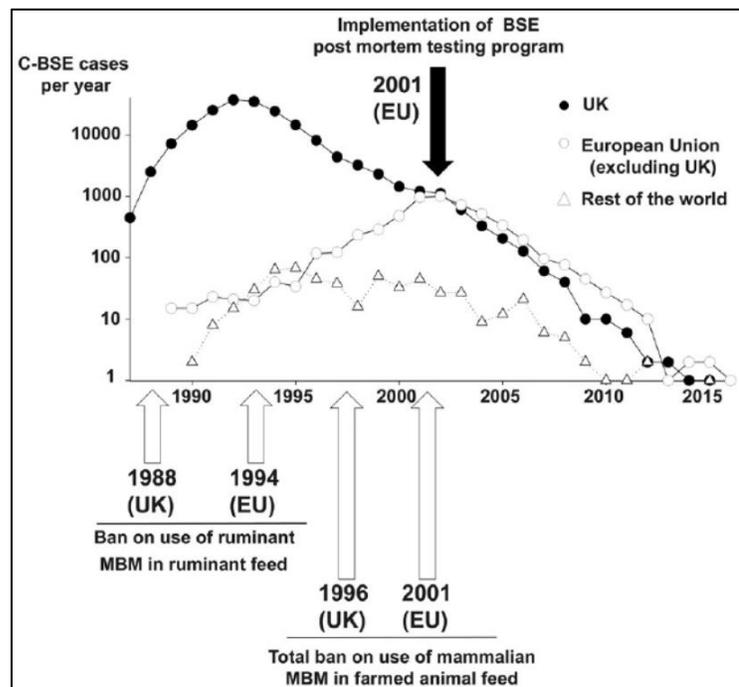


Figura 5. Casos diagnosticados de EEB entre 1989 y 2015 en Reino Unido, la Unión Europea y el resto del mundo Tomado de Houston y Andréoletti (2019).

Desde el Reino Unido, la EEB se propagó al menos a otros 28 países, alcanzando al año 2018 un total acumulado de 7891 casos en Europa y 60 casos el resto del mundo incluyendo a países como Brasil, Canadá, Israel y Japón. Actualmente la enfermedad se encuentra controlada y se han logrado reducir los casos de EEB a cifras de un solo dígito (Cassalone y Hope, 2018).

Si bien el origen de la EEB aún es una interrogante, estudios muy recientes han logrado demostrar la presencia de priones responsables de EEB en aislamientos naturales de cepas Nor98 de Scrapie (Scrapie atípico esporádico) (Hour et al., 2019). Esto, sumado a que existe evidencia de que la variante atípica Nor98 de Scrapie se encontraba en Reino Unido desde antes del surgimiento de la EEB (Chong et al., 2015), sugiere que estos animales pudieron haber ingresado a la industria del *rendering* y ser una fuente de priones infecciosos para los bovinos (Hour et al., 2019).

Dado el declive de los casos de EEB y el aumento de las presiones de la industria, las autoridades de la UE han comenzado a considerar la posibilidad de reincorporar las HCH a la alimentación animal (Hour et al., 2019). Estudios retrospectivos realizados en la Unión Europea han demostrado que la prevalencia del Scrapie atípico Nor98 se encuentra en 2-6 casos positivos por cada 10.000 animales testeados (BIOHAZ 2010; 2014), y a la luz de los resultados de Hour et al. (2019), cada caso podría implicar un nuevo riesgo de exposición a los priones infecciosos.

1.3. El fenómeno de cepas en la EEB.

A comienzos del año 2000, de forma independiente, tres grupos de investigadores documentaron las primeras evidencias del fenómeno de cepas en la EEB. Yamakawa et al. (2003) describieron en Japón un caso de EEB en un novillo de 23 meses de edad de raza Holstein Friesian, aparentemente sano, durante los programas de vigilancia epidemiológica activa. Si bien el agente causal parecía ser el mismo, se diferenciaba bioquímicamente de la forma clásica. Un año más tarde, se describen dos casos en Italia (Casalone et al.; 2004) y tres en Francia (Bicabe et al.; 2004), con priones bioquímicamente diferentes entre sí y de la proteína priónica clásica. Desde ese momento, la forma clínica descrita en 1986 fue denominada EEB clásica (cEEB) y la infección con las nuevas cepas se denominó cEEB atípica.

Dentro de la EEB atípica se reconocieron dos formas: H-cEEB y L-cEEB. H y L indican alto y bajo peso molecular de PrP^{Sc} respectivamente, al realizar un *western blot* luego de una digestión parcial con proteinasa K. La fracción desglicosilada de PrP^{Sc} muestra una banda más alta en la forma H y una ligeramente más baja en la forma L en la cEEB. Además, es posible el reconocimiento con anticuerpos del extremo amino terminal en la forma H (figura 6) (Boujon et al., 2016).

La vigilancia epidemiológica activa ha permitido identificar a la mayoría de los casos de EEB atípica, razón por la cual se conoce poco del comportamiento clínico natural de las formas H y L. Sin embargo, los estudios de infección experimental en bovinos han permitido caracterizar la sintomatología clínica. Se han reportado signos como: letargia, ansiedad, marcha y posturas anómalas, pérdida propioceptiva, ataxia, pérdida del estado general, mioclonías, e incapacidad para reincorporarse. Característicamente no se han observado cambios comportamentales como agresividad o nerviosismo (Konold et al., 2014; Okada et al., 2011).

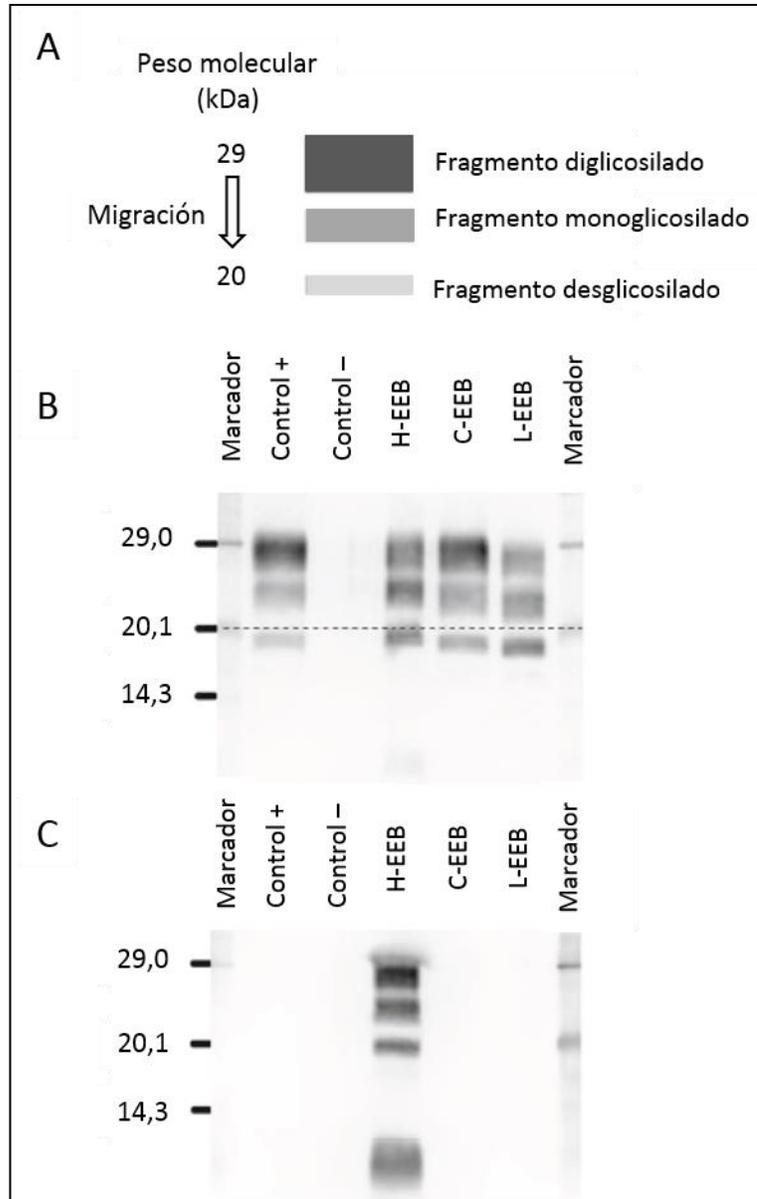


Figura 6. Diferenciación de los tipos de cEEB por Western Blot. **A**, representación del patrón de migración de PrP^{Sc} luego de ser tratada con proteinasa K. **B**, Diferencias de peso molecular de los fragmentos en cada tipo de cEEB en Western Immunoblot (anticuerpo Sha31) **C**, Anticuerpo N-terminal (12B2) unido exclusivamente a la forma H-cEEB. Tomado de Boujon et al. (2016).

Las formas atípicas se diferencian de la cEEB en varios aspectos. En primer lugar, tienden a afectar animales más longevos (12 años en promedio) en comparación con la forma clásica de la enfermedad (5 años en promedio). En un contexto epidemiológico, las formas atípicas han sido diagnosticadas también en países en los que no se reportaron casos de cEEB, y a diferencia de ésta, los casos atípicos se han mantenido

constantes en el tiempo (Bicabe et al., 2008). Estas observaciones han llevado a considerar que las formas H-EEB y L-EEB no guardan relación en sus orígenes con la cEEB y, al igual que en la ECJ, podrían tratarse de formas esporádicas (Boujon et al., 2016).

Existen diferencias neuropatológicas evidentes entre las formas atípicas y la cEEB. Las lesiones vacuolares se localizan en porciones más rostrales del encéfalo en la forma L y a nivel del tálamo en la forma H (Okada et al., 2011; Casalone et al., 2004). El tropismo celular que presenta cada cepa, probablemente esté relacionado con su estructura terciaria y cuaternaria que le permiten interactuar con diferentes moléculas (como receptores) y, en consecuencia, con diferentes tipos celulares (Aguzzi et al., 2008). Como el estado de glicosilación de PrP^C es diferente en las distintas poblaciones celulares, el propio patrón de glicosilación de PrP^{Sc} también podría tener que ver con aquel tropismo celular, propagándose mejor en aquellos tejidos que expresen un glicofoma similar de PrP^C (Collinge et al., 1996).

El fenómeno de cepas ha replanteado las posibles hipótesis del origen de la cEEB. Primariamente se la vinculaba con el Scrapie clásico (Willesmith et al., 1988). Sin embargo, no existe evidencia de transmisión del Scrapie a los bovinos por vía oral. La infección solo se ha logrado mediante la inoculación intracerebral del agente, desarrollado un cuadro clínico distinto a la cEEB, H-EEB y L-EEB (Konold et al., 2013). En este aspecto, las cepas atípicas tanto de Scrapie (Nor98) como de EEB podrían ser posibles candidatas (Acin et al., 2021).

Varios autores demostraron que las cepas atípicas de EEB se pueden transformar en una forma no diferenciable de cEEB tras pasajes seriados en roedores (Beringue et al., 2007; Capobianco et al., 2007, Baron et al., 2011; Torres et al., 2011). Esto amplió el abanico de hipótesis, postulándose que la cEEB pudo tener su origen en las formas atípicas (esporádicas) de la enfermedad. En este escenario, la transformación en la forma clásica conocida, podría haberse dado tras sucesivos pasajes en huéspedes intermediarios (bovinos u otra especie) que sistemáticamente ingresaban al proceso de “*rendering*” (Boujon et al., 2016).

1.4. Patogenia de la cEEB

En el caso de las enfermedades provocadas por priones infecciosos, la forma en que éstos alcanzan el SNC aún no se conoce por completo. Sin embargo, existe consenso en ciertos puntos del camino que siguen hacia la neuroinvasión. Si bien se ha demostrado en un gran número de trabajos que una de las vías más rápidas para reproducir la enfermedad es a través de la inoculación intracerebral (Aguzzi y Calella, 2009), es claro que no es igual en las infecciones naturales.

La ruta oral es la vía más conocida de infección natural, a través del consumo de raciones contaminadas con el agente infeccioso y de sustitutos lácteos contaminados administrados a terneros

(Wilesmith et al., 1988). Por este motivo, ha sido extensamente estudiada utilizando ensayos de infección y eutanasia a lo largo del periodo de incubación, y en el transcurso de la enfermedad clínica (Costassa et al., 2016).

El primer estudio acerca de la patogenia de la cEEB fue realizado por Wells et al. (1996) en Reino Unido, demostrando que la distribución del agente infeccioso se restringía a ciertos órganos y no era de forma generalizada. Trabajos posteriores demostraron que luego de la exposición oral, las placas de Peyer ilíacas eran el primer sitio de acumulación de PrP^{Sc} dentro de los 4-6 meses postinfección (mpi) (Terry et al., 2003; Hoffman et al., 2011), seguido de las tonsilas palatinas a los los 6-10 mpi (Wells et al., 2005). Estudios de infectividad de tejidos bovinos colectados secuencialmente entre los 20-30mpi, realizados en ratones transgénicos para el gen *PRNP* bovino, demostraron que las placas de Peyer ilíacas y las tonsilas palatinas eran infectantes en todos los tiempos del experimento, mientras que otros tejidos como los nerviosos, lo fueron luego del mes 27 (Espinosa et al., 2007).

El rol del íleon como una posible puerta de entrada de la PrP^{Sc} quedó de manifiesto en los trabajos realizados por Hoffman et al. (2011), quienes estudiaron las placas de Peyer del yeyuno, íleon, y de la unión ileocecal de animales sacrificados de 4-24 mpi (vía oral). Se encontró una acumulación temprana de PrP^{Sc} en las placas de Peyer en el íleon (4mpi), y aunque se observó también en las de la unión ileocecal, esta fue más tardía (a partir de 12mpi). No se encontraron señales claras de acumulación a nivel del yeyuno, sin embargo, el tejido resultó infectante, aunque menos que el íleon (Hoffman et al., 2011).

La manera en que PrP^{Sc} atraviesa los epitelios aún no es del todo clara, pero se piensa que lo hace a través de las células M, un tipo celular presente en el epitelio asociado a los folículos linfoides del intestino y de la tonsila palatina, cuya función es el transporte de macromoléculas (Heppner et al., 2001). Esto explicaría que durante los primeros 8mpi, la acumulación más temprana de PrP^{Sc} se observe a nivel de los macrófagos y células dendríticas de las placas de Peyer (Terry et al., 2003), y posteriormente en las células del sistema nervioso entérico (Hoffman et al., 2011).

La forma en que la PrP^{Sc} alcanzaría el sistema nervioso central (SNC) implica un patrón de diseminación centrípeto, en el que pasa del sistema digestivo a los tejidos nerviosos (Gough y Madisson, 2003). Este mecanismo ha sido especialmente estudiado en modelos de hámster infectados con la cepa de Scrapie 263K (Balkema-Buschmann et al., 2011), así como en ovejas afectadas por Scrapie (Jeffrey et al., 2006). A través de los plexos nerviosos localizados en la mucosa intestinal y los nervios mesentéricos, la PrP^{Sc} se acumularía en el complejo ganglionar celíaco mesentérico, para luego ascender a la porción torácica de la médula espinal a través de los nervios esplácnicos, y al tallo cerebral vía nervio vago y ganglio nodoso (Balkema-Buschmann et al., 2011; Kaatz et al., 2012; Corona et al. 2017).

Una vez alcanzada la médula espinal torácica, las partículas infecciosas avanzan rostralmente hacia la médula espinal craneal y caudalmente hacia la cauda equina (Balkema-Buschmann et al., 2011). Desde la médula espinal, la PrP^{Sc} se dispersa hacia los ganglios de las raíces dorsales de los nervios espinales, ganglio trigémino y ganglios cervicales (Arnorld et al., 2007). En la figura 7 se esquematiza el recorrido de los priones infecciosos desde el aparato digestivo hasta el SNC.

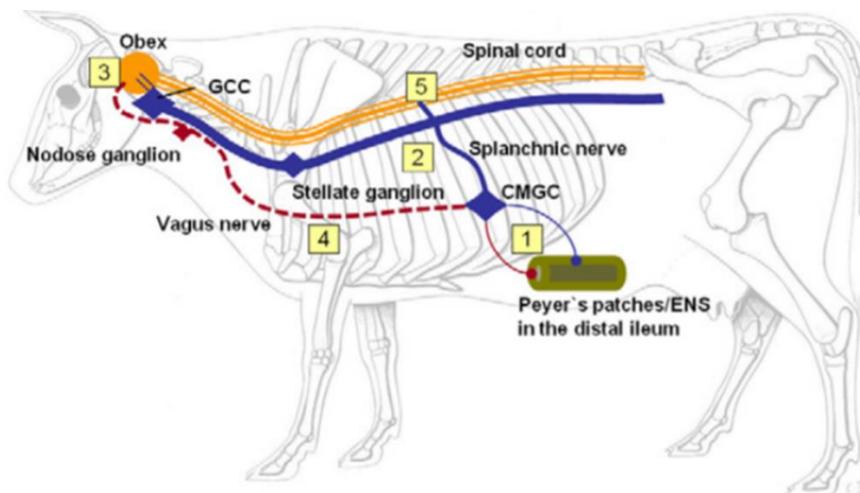


Figura 7. Proceso de neuroinvasión de los priones infecciosos luego de la exposición por vía oral. En naranja SNC, azul: porción simpática del sistema nervioso periférico (SNP), rojo: porción parasimpática del SNP. 1: invasión del complejo ganglionar celíaco mesentérico (GMGC). 2: ingreso de los priones a la cadena ganglionar simpática vía nervios esplácnicos. 3: invasión del tallo cerebral a través del ganglio cervical craneal (GCC), o a través del nervio vago y ganglio nodoso (4). 5: infección de la médula espinal a través de los nervios esplácnicos. Tomado de Kaats et al. (2012).

Por vía nerviosa, en momentos más tardíos la PrP^{Sc} parecería seguir un camino de diseminación centrífugo, alcanzando las glándulas adrenales, el nervio ciático, e incluso varios grupos musculares como el macetero, triceps braquial, semitendinoso y los músculos intercostales, a través de sus terminaciones nerviosas (Espinosa et al., 2007; Okada et al., 2014).

En lo que respecta a la patogenia de las formas atípicas de EEB (L y H), las rutas de dispersión no son claras, y pocos trabajos evalúan el tema. Sin embargo, se ha observado que en la forma L, tras la afección del cerebro, gran parte de los tejidos nerviosos periféricos se vuelven positivos a lo largo del tiempo, sin constatar evidencias de positividad de los tejidos linfoides, sugiriendo un patrón de diseminación centrífugo (Iwamaru et al., 2010). Observaciones similares se han realizado en varios trabajos de infección para las formas L y H, utilizando diferentes modelos animales, donde el SNC, los ganglios y nervios periféricos, las terminaciones nerviosas musculares, las glándulas adrenales y la retina se han visto positivos, no así el tejido linfoides o gastrointestinal (Costassa et al., 2016).

Si bien se ha develado parte de la patogenia de la enfermedad, aún existen varios aspectos sin dilucidar que permitan comprender por completo el comportamiento de los priones infecciosos dentro del organismo. Aunque la PrP^{SC} parecería acumularse en órganos con alta cantidad de PrP^C (Peralta y Eyestone, 2009), resta por conocer cómo las diferentes variaciones en la expresión del gen *PRNP* en esos órganos podría afectar la susceptibilidad y el progreso de la enfermedad.

1.5. Efectos socioecómicos de la cEEB

1.5.1. *La nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob*

El real impacto social y económico de la cEEB no llegaría hasta mayo de 1995 en Reino Unido. Lo que comenzó como un atípico caso de ECJ en un adolescente, se trasformaría oficialmente el 8 de marzo de 1996, en una nueva EET humana, denominada nueva variante de la ECJ (nvECJ). Las diferencias más importantes de esta nueva enfermedad con la ECJ clásica eran: la presentación a edades tempranas (edad media de muerte 28 años vs 66 años), fase clínica prolongada (14 meses vs 5 meses) y diferencias neuropatológicas. Para finales de marzo de 1996, los organismos oficiales darían a conocer su posible asociación con la cEEB. (Pattison, 1998; Budka y Will, 2015).

La evidencia más importante que apoyaba la relación de ambas enfermedades la aportaron Collinge et al. (1996). Estos autores compararon los patrones de digestión con proteinasa K de la proteína priónica infecciosa, de casos de nvECJ y cEEB. Este trabajo mostró claras diferencias entre el prion de la nvECJ y el de la ECJ clásica, así como su similitud con el prion de la cEEB. Los trabajos posteriores de Bruce et al., (1997) brindaron un apoyo cabal a la teoría, demostrando que el comportamiento del material infeccioso de la nvECJ, al inocularse en ratones, era idéntico al de la cEEB en cuanto al periodo de incubación y a las lesiones neuropatológicas.

Los alimentos contaminados con el prion de la cEEB fueron la vía más probable de transmisión de la enfermedad al humano (Pattison, 1998). En solo 10 años, la nvECJ alcanzaría proporciones pandémicas con 300 casos reportados en Reino Unido e Irlanda del Norte, 16 en Francia, tres en la República de Irlanda, dos en Estados Unidos y uno en España, Arabia Saudita, Japón, Italia, Países bajos, Portugal, y Canadá. Todos países con casos previos de cEEB a excepción de Arabia Saudita (Bradley et al., 2006).

1.5.2. *La cEEB en la percepción de riesgo*

Dado el potencial zoonótico y la naturaleza inevitablemente mortal de la enfermedad en humanos, la cEEB es la EET de mayor impacto socioeconómico en el mundo. Se estima que entre los años 1986 y 1996, 750.000 animales con cEEB fueron destinados al consumo humano en Gran Bretaña (Anderson et al., 1996). Se ha especulado que hasta 500.000 personas pudieron estar expuestas a los priones infecciosos

a partir de un sólo bovino infectado (Ghani et al., 2000). Esto alimentó la percepción de que millones de consumidores estuvieron en una situación de riesgo, poniendo en alerta a la opinión pública.

Los mercados internacionales respondieron de acuerdo al riesgo percibido. La demanda de carne vacuna en Reino Unido bajó, lo que llevó a una disminución de 21% en el precio. La población optó por carnes alternativas, que aumentaron su precio, como el cordero (19%) y el cerdo (21%), manteniéndose elevado hasta el año 2000. El precio de la carne bovina se mantuvo bajo desde el inicio de la crisis, reflejando un cambio duradero de la preferencia de los consumidores (Leeming y Turner, 2004).

En la UE, la crisis de Reino Unido produjo una reducción del 6% en el consumo de carne bovina, recuperando los niveles normales en un periodo de 4 años (Morgan, 2000). Varios países compradores de carne cerraron sus mercados a la UE. Japón cesó la compra de carne, productos elaborados con carne y semen de toros de origen europeo, realizando el 66% de las importaciones de productos bovinos en el periodo 1998-2001 desde Estados Unidos y Australia (Jin et al., 2004).

A pesar de las fuertes medidas restrictivas adoptadas por Japón, fue el primer país por fuera de la UE en comunicar un caso de cEEB, sufriendo pérdidas en el precio de la carne y en los niveles de consumo en el mercado interno. Países como China, Korea del Sur, Singapur, Malasia y Filipinas le cerraron los mercados (Jin et al., 2004). Situaciones similares han sido reportadas en todos los países en los que se ha diagnosticado cEEB. Un ejemplo de esto lo constituye Estados Unidos, donde un sólo caso de cEEB en el estado de Washington en 2003 representó una reducción de las exportaciones de carne bovina en 2004, con pérdidas valuadas aproximadamente en 3.5 billones de dólares (Murdoch y Murdoch, 2015).

1.6. El gen *PRNP* Bovino y la PrP^C

1.6.1. Estructura y función del gen *PRNP* bovino y de la PrP^C

El gen *PRNP* es altamente conservado, con un 83% de identidad nucleotídica y un 86% de identidad aminoacídica entre el bovino y el humano (Choi et al., 2006). En los bovinos se encuentra localizado en el cromosoma BTA13q17 (Ianuzzi et al., 1998), específicamente en la cadena *forward*. Tiene una longitud aproximada de 19Kb, extendiéndose entre las bases 47.039.699 y 47.058.759. Se organiza en cuatro exones y tres intrones (figura 8). Los exones uno y dos son pequeños (312 pb y 98 pb respectivamente) comparados con el tercer y cuarto exón, mayores en tamaño (730pb y 1429pb). El gen se transcribe en un ARNm de 2569pb que posteriormente se traduce en la proteína PrP^C de 260aa (ENSEMBL, 2021, <http://www.ensembl.org>).

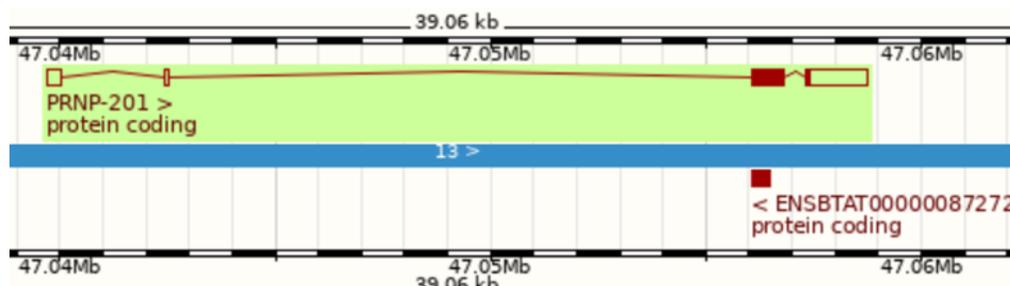


Figura 8. Esquema de la estructura del gen PRNP bovino (ENSMBL, 2021).

La PrP^C es una sialoglicoproteína monomérica soluble, altamente conservada (Castle y Gill, 2017), presente prácticamente en todo el organismo, con abundancia específica en el sistema nervioso central, particularmente a nivel neuronal (Zomosa-Signoret y col., 2007; Peralta y Eyestone, 2009). Su rol fisiológico aún es desconocido, aunque se le han atribuido funciones de protección celular frente al stress oxidativo y antiapoptosis, adhesión celular, desarrollo de neuritas, mantenimiento de la mielina, excitabilidad neuronal, citotoxicidad, funciones en el sistema inmune, mantenimiento del ritmo circadiano, homeostasis de iones metálicos (particularmente el cobre), homeostasis mitocondrial (Nicolas y col., 2009; Bremer et al., 2010; Biasini y col., 2012; Halliez y col., 2014; Kuffer et al., 2016; Nuvolone et al., 2016; Castle y Gill, 2017).

A pesar de existir pequeñas variaciones estructurales en la PrP^C, entre las diferentes especies de mamíferos, en todas hay una señal peptídica de secreción en el extremo amino terminal, que es eliminada durante su procesamiento, y que la dirigen a la membrana plasmática (Eraña, 2015). La síntesis de PrP^C comienza a nivel del retículo endoplásmico y es enviada a través del aparato de Golgi a la membrana citoplasmática, dónde se une mediante un dominio de anclaje glicosil fosfatidil inositol (GPI) en regiones conocidas como balsas lipídicas (Vey et al, 1996).

No toda la PrP^C se encuentra en la superficie de la célula, ya que está sujeta a ciclos de reciclaje endosómico (Sunyach y col., 2003), que permiten un control riguroso de la cantidad de PrP^C en la superficie celular (Castle y Gill, 2017). Además, existen reportes de PrP^C en el núcleo (Bravard y col., 2015) y en las mitocondrias (Faris y col., 2017). Estudios realizados sobre la PrP^C recombinante bovina demostraron que el extremo amino terminal forma un dominio flexible (de 108 aminoácidos entre los residuos 23 a 121), desestructurado, a modo de cola. A diferencia de esto, el extremo carboxilo terminal forma un dominio globular y organizado entre los residuos 121 y 230 (Figura 9) (López et al., 2000).

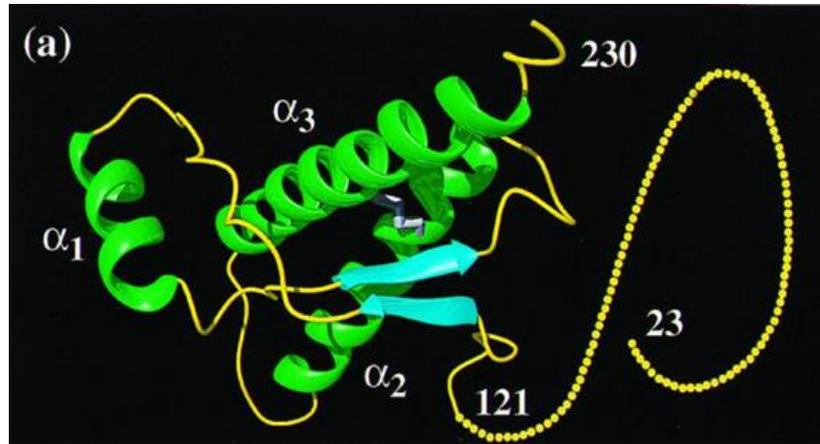


Figura 9. Estructura tridimensional de la PrPC recombinante bovina. Puntos en amarillo: dominio flexible, verde: hélices α (1, 2, 3), celeste: hojas β , gris: puente disulfuro. Tomado de: López et al. (2000).

El dominio globular contiene tres hélices α (1, 2, 3) entre los residuos aminoacídicos 144–154, 173–194, y 200–226, y una hoja β antiparalela que involucra a los residuos 128–131 y 161–164. Las hélices α_2 y α_3 se encuentran conectadas por medio de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 179 y 214 (López et al., 2000) (Ver figura 9). Además, se identifican dos sitios de N-glicosilación en las asparaginas 181 y 197, que permiten su procesamiento postraduccional (Hwang y Nicholson, 2018). Esta disposición estructural es muy similar a la reportada para la PrP^C recombinante humana (Pan y col., 1993; Riek y col., 1997; Haire y col., 2004; Aguzzi y col., 2008; Hwang y Nocholson, 2018).

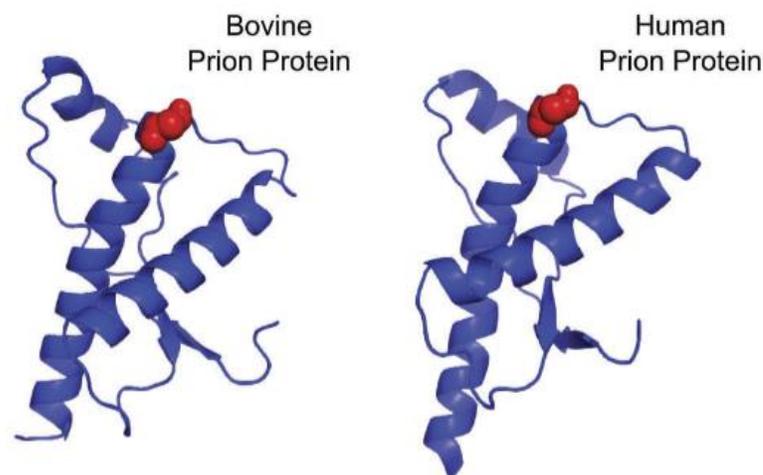


Figura 10. Estructura de la PrP^C. A la izquierda PrP^C bovina, a la derecha PrP^C humana. Tomado de Hwang y Nicholson (2018).

Los mecanismos moleculares que llevan a la transformación de la proteína priónica celular en su forma patológica no se conocen, sin embargo, de acuerdo a la teoría de “solo proteína” ocurriría un

plegamiento anormal de la proteína que se propagaría de forma autocatalítica. Hoy en día se ha aceptado que la conversión de PrP^C en PrP^{SC} es un evento postraducciona que ocurre después que PrP^C ha alcanzado su localización en el dominio extracelular de las membranas neuronales y/o posteriormente, durante el transporte vesicular de PrP al interior de la neurona (Weissmann y col., 1999).

La transformación de la PrP^C a su isoforma patológica PrP^{SC}, implica un cambio conformacional. En la PrP^{SC} el contenido de hojas β es mayoritario (40%) en relación al de hélices α (30%) (Ver figura 11) (Aguzzi y Calella, 2009), lo que sugiere que la conversión de hélices α a hojas β es un evento fundamental para la formación y propagación de PrP^{SC}.

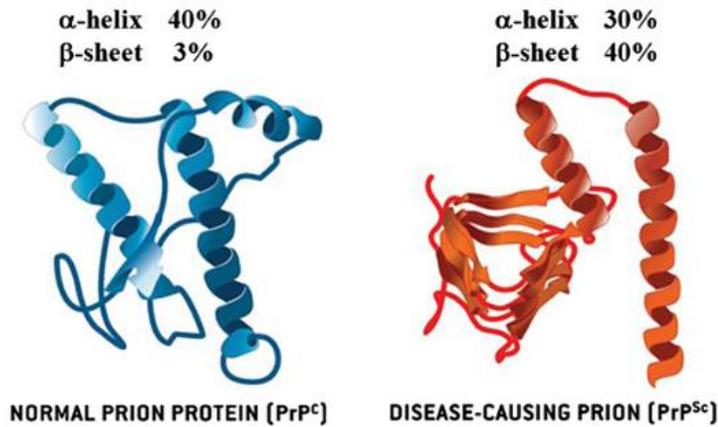


Figura 11. Esquema de la estructura tridimensional de PrP^C y PrP^{SC}. Azul: PrP^C (predominio de hélices α), Rojo: PrP^{SC} (predominio de hojas β). Tomado de Lee et al. (2012).

1.6.2. Regulación del gen *PRNP* bovino

Los mecanismos de regulación del gen *PRNP* son complejos. La región promotora se encuentra localizada corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Sander et al., 2004) y presenta sitios de unión específicos para la proteína represora RP58 (Sander et al. 2005) que actuaría modulando la expresión del gen. Sin embargo, existen otras regiones reguladoras de importancia. Ensayos realizados utilizando la metodología del gen reportero han demostrado que el exón 1 puede ser capaz de suprimir la expresión del gen en ausencia del intrón 1. La eliminación de un fragmento de ADN entre las bases 52 y 168 del exón 1 produce mayores niveles de expresión comparado con el exón 1 completo (Haigh et al., 2007), por lo que esa región reviste de importancia al aportar posibles elementos inhibitorios de regulación. Sumado a esto, la ausencia del exón 1 en variantes de *splicing* del ARNm de *PRNP* en el cerebro de los bovinos y ratones, aporta evidencia extra acerca de que la función del exón es diferente a la simple codificación de la proteína (Haigh et al, 2007).

El intrón 1 ha demostrado ser esencial para la completa actividad del promotor. Mediante ensayos de gen reportero se pudo demostrar que la delección del intrón 1 disminuye drásticamente la expresión del gen (Inoue et al., 1997). Elmonir et al. (2010) pudieron demostrar que delecciones en el intrón 1 entre las posiciones +313 y +892 reducen la transcripción del gen en un 50%, lo que sugiere la unión de potenciadores de la transcripción en esa región. Resultados similares han sido comprobados por otros investigadores (Nakamura et al., 2007; Xue et al., 2008; Xue et al., 2012).

El intrón 1 representa una región con funciones más complejas que un simple sitio de unión de potenciadores. Haigh et al. (2007) demostraron que, en ausencia del promotor, el intrón 1 es capaz de estimular la expresión del gen *PRNP* en niveles similares al promotor. En esa situación el exón 1 sólo era capaz de reprimir la transcripción si el intrón 1 no se encontraba presente. Esto demostró que el intrón tiene una capacidad promotora intrínseca o al menos accesoria al promotor.

Desde un punto de vista genómico el gen *PRNP* bovino se caracteriza por una gran abundancia de regiones GC (cajas GC) localizadas dentro del intrón 1. Particularmente SP1 (proteína específica 1) es un factor de transcripción que se une a regiones ricas en GC aumentando así la transcripción de los genes (Suske, 1999). De esta manera la acción coordinada del promotor con el intrón 1 permitiría una represión del gen mediante la interacción de RP58 con SP1 (Hasse et al., 2007). Es de interés resaltar que la enzima histona desacetilasa posee sitios de direccionamiento específicos para SP-1, por lo que la regulación de la expresión del gen *PRNP* podría estar mediada por dicha enzima (Doetzlhofer y col, 1999). En tal situación, la presencia de SP-1 jugaría un rol fundamental.

El gen *PRNP* bovino se expresa en la mayor parte de los tejidos corporales, siendo particularmente abundante en los tejidos nerviosos y linfoides (Tichopad et al., 2003; Sander et al., 2005), con una baja expresión en órganos como el músculo esquelético, pulmón y riñón (Tichopad et al., 2003). En la misma línea, los tejidos nerviosos y algunos linfoides han demostrado alta cantidad de PrP^C, siendo baja en la piel, pulmón, músculo esquelético, riñón, páncreas, e hígado (Peralta y Eyestone, 2009).

La diferencia en los niveles de expresión de *PRNP* en los diferentes órganos no puede ser explicada solamente por los mecanismos de regulación descritos anteriormente. Algunos autores sostienen que esas diferencias pueden deberse a diferentes perfiles en la expresión de factores de transcripción (que actúen como represores o activadores) y que estén directamente relacionados a la función del órgano o tejido (Haigh et al., 2007)

La expresión de *PRNP* comienza temprano durante el desarrollo, detectándose en embriones de ratón en todo el tubo neural y células indiferenciadas al día 13,5 (Manson et al., 1992) y en la sustancia gris de la médula espinal de embriones de pollo al día 6 (Harris et al., 1993). En embriones bovinos puede

detectarse al día 27, con un aumento de la transcripción del gen *PRNP* ya desde el día 4 (Peralta et al., 2012).

En los últimos años, Dalai et al. (2016), lograron determinar un nuevo elemento regulador en el gen *PRNP* del ratón que podría explicar sus diferentes niveles de expresión en los distintos órganos. Estos autores demostraron que los dinucleótidos CpG contenidos dentro de la región -599 y -279 presentaban patrones diferenciales de metilación. Particularmente el dinucleótido en posición -576 presentó una correlación negativa con los niveles de expresión de *PRNP*, quedando dentro del sitio CACGAG (caja N) de reconocimiento para moléculas reguladoras de la familia bHLH. En trabajos posteriores Dalai et al. (2017) confirmaron la metilación diferencial de la misma región utilizando la línea celular de carcinoma embrionario de ratón antes y después de la neurodiferenciación. En la medida en que los niveles de transcripción aumentaron con la neurodiferenciación, la metilación de dinucleótidos CpG disminuyó hasta en un 50%. Estos trabajos aportan evidencia de control epigenético en el gen *PRNP*, no reportado aún para el bovino o el humano.

1.6.3. Variación del gen *PRNP* bovino y modulación de la enfermedad.

Al igual que en otras especies, el gen *PRNP* ha sido motivo de intensos estudios en busca de variantes que pudieran estar asociadas con la susceptibilidad a las EETs. Esto ha hecho que un gran número de polimorfismos se hayan encontrado en las diferentes regiones del gen. En el caso de los bovinos se han descrito a la fecha 1385 variaciones, la mayoría (1270) corresponden a SNPs, mientras que 116 a polimorfismos de inserción/delección. Dentro de los exones sólo se han identificado 100 mutaciones, de las cuales el 97% corresponden a SNPs y el 3% restante a deleciones (ENSEMBL, 2021).

Polimorfismos en el gen *PRNP* han demostrado modular la susceptibilidad a las EETs en otras especies, como ratones (Cortez & Sims, 2013; Aguilar-Calvo et al., 2015), ovinos (Goldmann, 2008), caprinos (Curcio et al., 2016), ciervos (Robinson et al., 2012; Robinson et al., 2019), y humanos (Imran & Mahmood, 2011). En este aspecto, el gen *PRNP* bovino, ha sido previamente postulado como un locus candidato (Juling, 2006).

Ninguno de los polimorfismos en la región codificante del gen ha podido ser asociado de forma contundente con la susceptibilidad a la enfermedad, a excepción de la mutación E211K (Richt y Hall, 2008). Esta mutación se encuentra localizada en el codón 211, homólogo al codón 200 de los humanos, que aloja la mutación E200K responsable de los casos de ECJ familiar. La mutación E200K humana fue descrita inicialmente en 1989 y surgió al menos en cuatro oportunidades en casos no relacionados (Goldgaber et al., 1989; Lee et al., 1999), provocando el cambio del codón GAG (E= glutamina) por el codón AAG (K=

lisina). El alelo K tiene un efecto dominante, llevando al desarrollo de la enfermedad a edades avanzadas, aunque no todos los pacientes enferman (Cohen et al., 2016).

En los bovinos, la mutación E211K provoca una transición G→A, que transforma al codón GAA (E= glutamina) en AAA (K= lisina). El alelo K se vio asociado a un caso de cEEB atípica, presentando una prevalencia muy baja (1/2000 animales, Richt y Hall, 2008). Desde entonces, ese polimorfismo no se ha encontrado nuevamente en otras poblaciones bovinas (Richt y Hall, 2008; Heaton et al., 2008; Gurgul et al., 2012; Sanches, 2014; Kim y Jeong, 2017), a excepción de la forma somática en médula oblonga de algunos animales clínicamente sanos (Won et al., 2020).

La búsqueda de mutaciones en las regiones no codificantes de *PRNP* revelaron la presencia de dos variantes del tipo inserción/delección -Indel- que han demostrado estar asociados con la susceptibilidad a la cEEB. El primer polimorfismo corresponde a un indel de 23pb en la región promotora del gen, mientras que el segundo a un indel de 12pb en el intrón 1 (Sander et al., 2004). Varios trabajos han respaldado esas observaciones (Sander et al; 2005; Juling et al., 2006; Hasse et al., 2007; Gurgul et al., 2012), excepto Nakamitsu et al., (2006), quienes atribuyen la no asociación a un bajo número de animales enfermos en el estudio.

Estudios de caso control, utilizando animales sanos y animales afectados de cEEB, han demostrado que los genotipos de delección para ambos indel están sobrerrepresentados en los animales enfermos (Sander et al; 2004, 2005; Juling et al., 2006; Hasse et al., 2007; Gurgul et al., 2012). La base biológica del efecto de esos polimorfismos sobre la susceptibilidad a la enfermedad fue aportada por Sander et al. (2005) quienes, mediante análisis *in silico* del gen, lograron demostrar que los polimorfismos Indel-23pb e Indel-12pb se encontraban en sitios de unión para factores reguladores de la transcripción, afectando la expresión de PrP^C. El alelo de inserción de 23pb es el sitio de unión de la proteína represora RP58, quien ejerce su efecto gracias a la interacción con la proteína SP1 (Lee et al., 2002). SP1 se uniría en el alelo de inserción de 12pb (Hasse et al., 2007) de forma que cuando las delecciones están presentes se induciría a fallas en la regulación del gen. La imposibilidad de reprimir la actividad de *PRNP* podría generar, al menos de forma teórica, un aumento en la cantidad de PrP^C (Sander et al., 2005).

La hipótesis de que diferencias en los niveles de expresión de *PRNP* pudieran afectar la susceptibilidad se sustenta en los trabajos realizados anteriormente utilizando modelos murinos. En los ratones transgénicos, portadores de una sola copia funcional del gen *PRNP*, se observó una menor cantidad de PrP^C. Cuando estos animales eran desafiados con partículas priónicas infecciosas, presentaban un incremento en el tiempo de incubación en relación a los animales normales, siendo los animales *knockout* totalmente resistentes (Vilotte et al., 2001). Estas observaciones, probablemente puedan deberse a que a

mayor cantidad de PrP^C, mayor es la cantidad de sustrato para la amplificación autocatalítica inducida por molde de PrP^{SC}, acelerando el desarrollo del proceso patológico.

En la literatura consultada, solo dos trabajos han estudiado tejidos de bovinos sanos, en relación al efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb sobre los niveles de expresión de *PRNP*. No han resultado del todo concluyentes, mostrando una gran variación en cuanto al tejido. Sander et al. (2005), no encontraron efecto del genotipo para el marcador indel23pb en tronco encefálico, hígado y bazo, sin embargo, observaron un fuerte efecto del genotipo D23-D23 en linfonodo mesentérico, aumentando los niveles de expresión de *PRNP*. La misma línea siguen los resultados de Msalya et al. (2011) en médula oblonga, donde el genotipo D23-D23 aumenta significativamente la expresión de *PRNP* en la raza Japanese Black, sin embargo, no encuentran efecto cuando lo estudian en la raza Japanese Brown.

En lo que respecta al polimorfismo indel12pb, Sander et al. (2005), tampoco encuentran efecto del genotipo en tronco encefálico, hígado y bazo, sin embargo, observaron un fuerte efecto del genotipo I12-D12 en linfonodo mesentérico, aumentando los niveles de expresión de *PRNP*, al igual que reporta Msalya et al. (2011) en médula oblonga. La forma en que ambos polimorfismos afectan la expresión de del gen parece ser distinta entre los tejidos, sin embargo, más estudios deben realizarse, principalmente en los órganos que forman parte de la patogenia de la cEEB.

Es importante señalar que otras combinaciones haplotípicas dentro de *PRNP*, diferentes a los indel23pb e indel12pb han sido asociadas con los casos clásicos de la enfermedad (Murdoch et al., 2010), así como otras regiones cromosómicas (Murdoch et al., 2011), pero no han sido confirmadas por trabajos posteriores. Por esta razón, los polimorfismos indel23pb e indel12pb, hasta el día de hoy, continúan siendo los mayores determinantes de la susceptibilidad genética a la cEEB.

Se ha sugerido que la selección a favor de los alelos de inserción podría ser una medida adecuada para disminuir el riesgo genético de la cEEB, en casos de reemergencia de la enfermedad (Juling et al., 2006). Sin embargo, no se conoce el efecto que los indel pueden tener sobre caracteres de interés productivo, más allá de trabajos aislados en características de producción de leche en la raza Jersey (Rzewucha-Wójcik et al., 2013), de crecimiento en razas bovinas nativas de China (Yang et al., 2018), así como con características de calidad espermática en toros Holstein Friesian (Guan et al., 2014).

Las frecuencias alélicas para las Indel de 23pb y 12pb han sido estudiadas en varias poblaciones bovinas, aunque poco se conoce de la distribución del gen en razas carniceras. Particularmente en la raza Aberdeen Angus, según el relevamiento bibliográfico realizado, sólo se ha descrito la estructura poblacional de *PRNP* en Brasil (Kerber et al., 2008; Sanches et al., 2016) y Japón (Zhu et al., 2011). En la región, la

distribución de los polimorfismos indel es escasa tanto para razas locales como para la mayoría de las razas comerciales de carne y leche.

En base a los antecedentes planteados, el objetivo de este trabajo de tesis fue determinar la frecuencia de los polimorfismos indel23pb e indel12pb en animales de las razas Aberdeen Angus puro y cruza con Hereford, Holstein Friesian y Criollo Uruguayo. Además, evaluar el efecto de esos polimorfismos sobre características de interés cárnico en la raza Aberdeen Angus, y el efecto sobre los niveles de expresión de *PRNP* en dos órganos de importancia para la patogenia de la cEEB (médula espinal cervical y tonsila palatina).

1.7. HIPÓTESIS

Los marcadores indel23pb e indel12pb son polimórficos en la raza Aberdeen Angus y su cruce con Hereford, y en las razas Criollo Uruguayo y Holstein Friesian de Uruguay. Esos polimorfismos se encuentran asociados con características de interés cárnico, y los genotipos de delección (D23-D23 y D12-D12) se asocian a mayores niveles de expresión (ARNm) del gen *PRNP* en médula espinal cervical y en tonsila palatina.

1.8. OBJETIVO GENERAL

- 1) Analizar la dinámica poblacional de los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* en una muestra de bovinos Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Criollo Uruguayo y Holstein Friesian de Uruguay.
- 2) Analizar el efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb sobre características de interés cárnico, y el nivel de expresión del gen *PRNP* en médula espinal cervical y tonsila palatina bovinas.

1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y diplotípicas de los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* en las muestras analizadas.
- 2) Determinar si las poblaciones se encuentran en equilibrio génico de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento para los marcadores analizados.
- 3) Analizar la asociación de los polimorfismos indel23pb e indel12pb con características de la carne y la canal en bovinos Aberdeen Angus de Uruguay.
- 4) Evaluar si el genotipo para los marcadores indel23pb e indel12pb afecta los niveles de transcripción del gen *PRNP* en muestras de médula espinal cervical y tonsila palatina bovinas.

Esta tesis de maestría se presenta bajo la modalidad de artículos científicos, y es una continuidad de la línea de trabajo comenzada en mi tesis de grado.

Artículo 1: en este artículo se analiza la distribución de los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* bovino en grupos raciales altamente seleccionados (Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian) y en una raza generada en nuestro país sin selección artificial (Bovino Criollo Uruguayo). Se comparan los resultados obtenidos entre los grupos raciales mencionados, así como con las reportadas en la bibliografía internacional. Con este artículo se da cumplimiento a los objetivos específicos 1 y 2.

Artículo 2: con los genotipos para los polimorfismos indel23pb e indel12pb generados en mi tesis de grado, en este artículo se realiza la asociación de esos marcadores con características de interés de la carne y la canal en bovinos Aberdeen Angus. Con este artículo se da cumplimiento al objetivo específico 3.

Artículo 3: en este artículo se analiza el efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* sobre sus niveles de expresión en tonsila palatina y médula espinal cervical bovinas. Con este trabajo se da cumplimiento al objetivo específico 4.

II. POLIMORFISMOS INDEL12PB E INDEL23PB DEL GEN *PRNP* EN BOVINOS DE CUATRO RAZAS DE URUGUAY LIBRES DE ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA

Indel12pb and indel23pb polymorphisms of the *PRNP* gene in four cattle breeds from Uruguay free from Bovine Spongiform Encephalopathy

Polimorfismos del gen *PRNP* en cuatro razas bovinas de Uruguay

Rody Artigas^{1*}, Noelia Vazquez², Paula Nicolini³, Silvia Llambí¹, Eileen Armstrong¹.

Unidad Académica de Genética y Mejora Animal. Departamento de Producción Animal y Salud de los Sistemas Productivos. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Udelar).

*LasPlaces 1550, Montevideo Uruguay. Tel.: +59826285802, rodyartigas@gmail.com.

Fuente de financiación principal: CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica), Udelar.

Este Artículo deriva del trabajo de tesis de Maestría del Dr. Rody Artigas.

¹ Unidad Académica de Genética y Mejora Animal. Departamento de Producción Animal y Salud de los Sistemas Productivos. ²Unidad Académica de Anatomía. Departamento de Biociencias Veterinarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República (Udelar). Centro Universitario de Tacuarembó. Instituto Superior de la Carne. Área Biología Molecular. ³Universidad de la República.

RESUMEN

La Encefalopatía espongiforme bovina (cEEB) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva transmisible de los bovinos, caracterizada por el acúmulo en el cerebro de una isoforma patológica (Prp^{SC}) de la proteína prión celular (Prp^C). Dos polimorfismos de inserción/delección en el gen *PRNP* (de 23pb en el promotor y de 12pb en el intrón 1) han sido asociados con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue analizar la distribución de esos polimorfismos en 214 bovinos sanos, pertenecientes a cuatro grupos raciales diferentes (Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian y Criollo Uruguayo). Las muestras de ADN fueron amplificadas por PCR a tiempo final. Se encontró una alta frecuencia de los alelos y del haplotipo de susceptibilidad (del12 y del23, y del12-del23, respectivamente) en los animales Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford y Holstein Friesian, mientras que la raza Criollo Uruguayo presentó una mayor frecuencia de los alelos y del haplotipo de resistencia (ins12 e ins23; e ins12-ins23, respectivamente). Estos datos podrían indicar una mayor resistencia genética del Criollo Uruguayo a la cEEB que las otras razas analizadas, revalorizándolo como recurso zoogenético.

Palabras claves: Prión, gen *PRNP*, bovino, polimorfismo indel.

ABSTRACT

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) is a transmissible progressive neurodegenerative disease of cattle, characterized by the accumulation in the brain of a pathological isoform (Prp^{SC}) of the cellular prion protein (Prp^C). Two insertion/deletion polymorphisms in the *PRNP* gene (23bp in the promoter and 12bp in intron 1) have been associated with resistance or susceptibility to disease. The objective of this work was to analyze the distribution of these polymorphisms in 214 healthy bovines, belonging to four different breed groups (Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian and Uruguayan Creole cattle). DNA samples were amplified by end-time PCR. A high frequency of the alleles and haplotype associated with susceptibility to BSE (del12 and del23, and del12-del23, respectively) were

found in the Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford and Holstein Friesian animals, while the Uruguayan Creole cattle presented a higher frequency of the alleles and haplotype associated with resistance to BSE (ins12 and ins23, and ins12-ins23, respectively). These data could indicate a greater genetic resistance of the Uruguayan Creole cattle to BSE in comparison with the other analyzed breeds, reinforcing its value as a zoogenetic resource.

Key words: prion, *PRNP* gene, cattle, indel polymorphism.

INTRODUCCIÓN

La encefalopatía espongiforme bovina (cEEB) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de los bovinos, perteneciente a la familia de las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) junto al Scrapie de los ovinos y caprinos y la enfermedad de Creutzfeldt Jacobs de los humanos, entre otras. Es causada por la acumulación en el sistema nervioso central de una isoforma patológica (PrP^{Sc}) de la proteína prión celular (PrP^C) (Wilesmith et al. 1991).

La PrP^C está codificada por el gen *PRNP* localizado en el cromosoma bovino BTA13 región q17 (Ianuzzi et al. 1998). En las últimas décadas, dos polimorfismos de inserción/delección (indel), uno de 12pb en el intrón 1 y otro de 23pb en el promotor, han sido asociados con una mayor susceptibilidad a la forma clásica de la enfermedad (cEEB). Al comparar animales sanos con animales afectados por cEEB, se ha observado que el haplotipo 12del-23del es más frecuente en los animales enfermos que en los sanos (Hasse et al., 2007; Kashkevich et al. 2007; Murdoch et al., 2010; Gurgul et al. 2012).

Análisis *in silico* de *PRNP* lograron demostrar que el alelo de inserción de 23pb actúa como un sitio de unión para el represor RP58, mientras que el alelo de inserción de 12pb actúa como sitio de unión

para la proteína específica 1 (SP1) (Sander et al. 2005). De este modo, cuando ambos alelos de inserción están presentes (haplotipo 12in-23in), RP58 se uniría al promotor ejerciendo su efecto represor gracias a la interacción con SP1 (Lee et al. 2002). En contraparte, el haplotipo 12del-23del induciría fallas en la regulación del gen produciendo mayores niveles de expresión (Sander et al. 2005).

El efecto de los alelos de delección se ha tratado de establecer de forma independiente. Algunos estudios indican que el alelo del23 tendría mayor impacto sobre la susceptibilidad a la enfermedad que el alelo del12 (Sander et al., 2004; 2005; Jeong et al. 2006; Vernerova et al. 2014). En este sentido, Geldermann et al. (2006) estudiando 252 animales con cEEB y 376 animales sanos no encontró asociación del alelo del12 con la susceptibilidad a la enfermedad, sin embargo, Juling et al. (2006) y Kashkevich et al. (2007) comunican un mayor efecto del alelo del12. Nakamitsu et al. (2006) no encuentran diferencias en las frecuencias de los alelos de delección entre un grupo de animales sanos y otro de afectados por cEEB, sin embargo, el número de individuos enfermos (n=6) era demasiado pequeño para sustentar esa observación. A pesar de todo esto, se ha propuesto que la selección en contra de los alelos de delección podría ser una alternativa para reducir la susceptibilidad de los rodeos a la cEEB (Juling et al. 2006), ante eventuales epidemias de la enfermedad.

La distribución de los polimorfismos indel12pb e indel23pb ha sido establecida en varias razas bovinas, sin embargo, pocas poblaciones de la raza Aberdeen Angus han sido estudiadas a nivel internacional, existiendo, además, escasos reportes para este gen en bovinos Criollos sudamericanos. El Criollo Uruguayo es una raza local, descendiente de los animales introducidos al país por Hernando Arias de Saavedra en 1611, de la cual solo queda un núcleo puro de 600 animales en el Parque Nacional de San Miguel (Uruguay, departamento de Rocha; 33°41' latitud Sur, 53°27' longitud Oeste) (Armstrong et al., 2021). Las razas Aberdeen Angus y Holstein Friesian se encuentran entre las razas comerciales de carne y leche, respectivamente, más abundantes del país. El objetivo de este trabajo fue determinar el

comportamiento poblacional de los polimorfismos indel12pb e indel23pb en bovinos de la raza Aberdeen Angus, cruce Aberdeen Angus x Hereford, Criollo Uruguayo y Holstein Friesian de Uruguay.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se analizaron 214 bovinos sanos (Aberdeen Angus n=76; Aberdeen Angus x Hereford n=22; Holstein Friesian n=30 y Criollo Uruguayo n=86). Los animales Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford pertenecían a establecimientos de la región Este del país y fueron muestreados en plantas de faena, tomando muestras de médula espinal cervical. Los muestreos se realizaron en días diferentes, seleccionando animales de diferentes tropas y establecimientos. Las muestras de las razas Holstein Friesian y Criollo Uruguayo pertenecían al banco de ADN del Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria, Udelar. Las muestras de animales Holstein Friesian pertenecían a animales no emparentados y provenían de diferentes establecimientos y regiones del país, las de Criollo Uruguayo pertenecían al núcleo de animales puros del Parque Nacional de San Miguel.

Extracción de ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa

Las muestras de ADN de las razas Holstein Friesian y Criollo Uruguayo habían sido previamente extraídas utilizando el método reportado por Green & Sambrook (2012) a partir de sangre entera periférica colectada entre los años 2014 y 2018. Las muestras de ADN de la raza Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford fueron extraídas a partir de 30mg de médula espinal, que fueron cortados finamente y tratados con 5 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y 500 μ L de buffer de digestión (50 mM Tris base pH 8.0, 20mM EDTA y 2% de SDS) e incubados toda la noche a 56 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (16.128 g/10min) y el sobrenadante se trató con 250 μ L de fenol y 250 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se centrifugaron (16.128 g/10 min) y el sobrenadante se trató con 50 μ L de NaCl (2M) y 2 volúmenes de etanol absoluto helado. Los tubos se mantuvieron a -20 °C por dos horas. El ADN se

recuperó por centrifugado (21.952 g/10min), se lavó con etanol 70% y, una vez seco, se resuspendió en bufer TE (10 mM de Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

Los polimorfismos indel12pb e indel23pb fueron amplificados en dos reacciones de PCR independientes, utilizando los primers previamente diseñados por Galvão et al. (2012) y Sander et al. (2004) respectivamente. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Rotor Gene Q (Corbett Research) en un volumen final de 20 µL conteniendo: 10 µL de QuantiNova SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN, Alemania), 10pmol de cada primer y 50ng de ADN. La amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de: 95 °C por 30 s, 56 °C (indel23) o 58 °C (indel12) por 30 s, 72 °C por 30 s y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Genotipado y análisis estadístico

Los amplicones obtenidos fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 4%, utilizando GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltd., China) como agente colorante y marcador de peso molecular de 100pb (SBS Genetech Co., Ltd., China). La visualización se realizó con un sistema de documentación de geles BIOTOP-SC805 y el software BioSens Gel Imaging System V2.0 (Shanghai Bio-Tech Co., Ltd., China).

Para el cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas, así como para el análisis de equilibrio de Hardy y Weinberg (mediante el test exacto de Fisher), se utilizó el software de acceso libre Genepop 4.7.5 (Raymond & Rousset, 1995) disponible en: http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html. Las frecuencias de los haplotipos y diplotipos fueron calculadas mediante conteo directo. Dado que se encontraron animales doble heterocigotas, la frecuencia del diplotipo 12ins-23ins/12del-23del fue calculada a partir de la frecuencia de los haplotipos certeros según Galvão et al. (2012), utilizando la ecuación de probabilidad condicional:

$$P(12ins-23ins/12del-23del) = [P(12ins-23ins) \times P(12del-23del)] / [P(12ins-23ins) \times P(12del-23del)] + [P(12in-23del) \times P(12del-23in)]$$

La comparación entre las poblaciones fue realizada mediante test de Chi cuadrado y el desequilibrio de ligamiento (D, D' y r) se evaluó de acuerdo a Lewontin (1988) utilizando hojas de cálculo de Microsoft EXCEL. Para todas las comparaciones un *P* valor menor a 0.05 fue considerado como significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para ambos marcadores se obtuvieron fragmentos de amplificación en todos los animales analizados. Para el polimorfismo indel12pb se observaron amplicones de 412pb correspondientes al alelo de inserción, mientras que para el alelo de delección se observaron amplicones de 400pb. Para el polimorfismo indel23pb se observaron amplicones de 123pb correspondientes al alelo de inserción y de 100pb para el alelo de delección (fig. 1). Estos resultados fueron concordantes con lo reportado por Galvão et al. (2012) para el polimorfismo indel12pb y con Sander et al. (2004) para el polimorfismo indel23pb. Las frecuencias genóticas observadas y las frecuencias alélicas se muestran en el cuadro 1.

Los alelos de delección estaban presentes en una alta frecuencia para Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford y Holstein Friesian. Esto no fue así en Criollo Uruguayo, donde la frecuencia de los alelos de delección fue menor al del resto de las razas estudiadas, siendo en caso del Criollo mayoritaria la frecuencia de los alelos de inserción. Se ha observado en diferentes estudios que las frecuencias para el alelo de delección en ambos polimorfismos varían entre las diferentes razas bovinas. En los animales Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford estudiados, la frecuencia del alelo de delección de 12pb (0.80 y 0.84 respectivamente) fue superior a la reportada en la literatura para la raza Aberdeen Angus (rango 0.46 a 0.63), aunque menor a la reportada en Hereford (0.88). En Holstein Friesian la frecuencia fue intermedia (0.58) a la reportada para la raza (rango 0.42 a 0.74) (cuadro 2).

En lo que respecta a la frecuencia del alelo de delección de 23pb en los animales Aberdeen Angus (0.78) y Aberdeen Angus x Hereford (0.68) estudiados, fue similar a la reportada en la literatura para la

raza Aberdeen Angus (rango 0.73 a 0.81), aunque francamente menor a la observada en Hereford (0.98). Asimismo, la frecuencia de ese alelo en los animales Holstein Friesian analizados (0.67) se encontró dentro del rango comunicado para la raza (rango 0.55 a 0.79) (cuadro 2).

El comportamiento poblacional de los polimorfismos indel12pb e indel23pb ha sido establecido en pocas razas locales sudamericanas de bovinos. Si bien la frecuencia de los alelos de delección en Criollo Uruguayo (0.45) es mayor a la reportada en ambos marcadores para la raza brasileña Caracú (del12=0.30; del23=0.28) y en la indel12pb para la raza Franqueiro (del12=0.33; del23=0.64), es menor a la comunicada para las diferentes poblaciones de Aberdeen Angus, Hereford y Holstein Friesian de otros países (cuadro 2). El bovino Criollo Uruguayo es una raza local con un restringido número de animales en una sola población pura, por lo que, tal como plantea Kerber et al. (2008) para la raza Franqueiro, no es posible establecer si esta diferencia se debe a un efecto fundador de la población, a un cuello de botella o a los efectos directos o indirectos de la selección natural a lo largo de los siglos de adaptación a condiciones ambientales desfavorables. No obstante, se ha observado que la frecuencia de los alelos de delección tiende a ser menor en las razas bovinas primitivas menos seleccionadas que en las razas modernas, altamente seleccionadas (Gurgul et al., 2012). De todas formas, todas las poblaciones analizadas para ambos marcadores se encontraron en equilibrio génico de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$) lo que indicaría ausencia de selección sobre este gen.

La raza Aberdeen Angus y su cruce con Hereford no difirieron entre sí para el marcador indel 12pb ($P > 0.05$), sin embargo, fueron diferentes a la raza Holstein Friesian y Criollo Uruguayo ($P < 0.05$). Estas últimas razas no difirieron entre sí para ese marcador ($P > 0.05$). Para el polimorfismo indel23pb no se observaron diferencias entre Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford y Holstein Friesian, sin embargo, fueron significativamente diferentes al Criollo Uruguayo ($P < 0.05$) (cuadro 1).

Al considerar ambos marcadores, se detectaron los cuatro haplotipos posibles en Holstein Friesian y Criollo Uruguayo y tres en Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford. Su distribución no difirió

significativamente entre la raza Aberdeen Angus y la cruce Aberdeen Angus x Hereford ($P > 0.05$) pero sí con Holstein Friesian y Criollo Uruguayo ($P < 0.05$) (cuadro 3). El haplotipo ins12-ins23 relacionado con una mayor resistencia genética a la cEEB (Sander et al., 2004; Juling et al., 2006; Hasse et al., 2007; Kashkevich et al. 2007; Hreško et al., 2009; Murdoch et al., 2010; Gurgul et al. 2012) fue más abundante en el Criollo Uruguayo (0.52) que en Holstein Friesian y estuvo ausente en Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford. Una alta frecuencia del haplotipo ins12-ins23 ya ha sido observada en las razas Pardo Suizo, German Brown y Swiss Schwarzfleck (Juling et al., 2006; Hasse et al., 2007), donde su frecuencia se encuentra por encima del 50%.

En relación al haplotipo del12-del23 (relacionado a una mayor susceptibilidad a la cEEB) fue el más frecuente en los animales Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford y Holstein Friesian estudiados (cuadro 3). Si bien es cierto que estas razas presentan una distribución de haplotipos desfavorables en relación a la susceptibilidad genética a la cEEB, no es diferente a la reportada internacionalmente para la raza Aberdeen Angus (Kerber et al., 2008; Zhu et al., 2008) y Holstein Friesian (Juling et al., 2006; Jeong et al., 2006; Hasse et al., 2007; Czarnik et al., 2007; Brunelle et al., 2008; Gurgul et al., 2012) aunque sí fue menor a la comunicada en Hereford (0.88) (Zhu et al., 2008).

Los haplotipos calculados en este trabajo para las cuatro razas muestran desequilibrio de ligamiento (LD) entre los marcadores, de 88% para la raza Criollo Uruguayo ($D' = 0.88$; $P < 0.05$) y de 84% para la raza Holstein Friesian ($D' = 0.84$; $P < 0.05$). Para las razas Aberdeen Angus y la cruce de Aberdeen Angus x Hereford el valor de D' fue de -1.0, explicado por la ausencia de uno de los haplotipos, de todas formas, ambos marcadores también están ligados en estos animales ($P < 0.05$) (cuadro 4). Resultados similares han sido reportados para estas y otras razas por diferentes autores (Sander et al., 2004; Clawson et al., 2006; Juling et al., 2006; Kerber et al., 2008; Zhu et al., 2008; Galvão et al., 2012; Yang et al., 2017), hecho probablemente relacionado con la distancia que separa a ambos polimorfismos dentro del gen (< 2 Kpb, Brunelle et al., 2008).

El LD parece ser mayor en Criollo Uruguayo y Holstein Friesian que en Aberdeen Angus y su cruce con Hereford. Esto puede responder al efecto fundador en Criollo Uruguayo, sumado a que se trata de una población cerrada, sin flujo de animales, y a la endogamia en Holstein Friesian, favorecida por la IA con pocos toros. Los aumentos en la homocigosidad limitan la efectividad de la recombinación, manteniéndose de esta forma los haplotipos (Morrel et al., 2005).

De los 10 diplotipos posibles para los polimorfismos indel12pb e indel23pb en los animales Aberdeen Angus y en su cruce con Hereford se detectaron cinco, mientras que en Criollo Uruguayo y Holstein Friesian se observaron ocho (cuadro 5). El diplotipo 12ins-23ins / 12del-23ins no se observó en ninguno de los animales estudiados, probablemente por la ausencia del haplotipo 12in-23in en los animales Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford y por la baja frecuencia del haplotipo 12del-23in en los animales Holstein Friesian y Criollo Uruguayo. El diplotipo más frecuente en los animales Aberdeen Angus (0.5) y Aberdeen Angus x Hereford (0.41) fue el 12del-23del / 12del-23del, mientras que en Criollo (0.5) y Holstein Friesian (0.4) fue 12ins-23ins / 12del-23del. Particularmente en la raza Criollo Uruguayo el diplotipo 12ins-23ins / 12ins-23ins fue el segundo en abundancia (0.27).

La distribución de diplotipos para los polimorfismos estudiados en este trabajo resultan de importancia para comprender la susceptibilidad genética de las poblaciones bovinas a la cEEB. Estudios realizados previamente demostraron que los animales que presentan el diplotipo del12-del23 / del12-del23 tienen 1.76 (Juling et al., 2006) a 2.68 (Hasse et al., 2007) veces más riesgo de desarrollar cEEB que los animales de diplotipo ins12-ins23 / ins12-ins23, cuando las condiciones ambientales son favorables y en presencia del agente infeccioso. Sin embargo, en la raza German Brown, donde el haplotipo ins12-in23 es muy frecuente, los animales de diplotipo ins12-ins23 / del12-del23 fueron los más afectados por la enfermedad, remarcando de esta manera la mayor susceptibilidad del haplotipo del12-del23 (Juling et al., 2006). La cEEB no ha sido diagnosticada históricamente en Uruguay, siendo considerado un país de riesgo insignificante a padecerla (OIE, 2021). En este contexto, el conocimiento de la distribución genética de los

polimorfismos indel12pb e indel23pb en las diferentes razas bovinas podría constituir una herramienta de valor en los programas de prevención de la enfermedad.

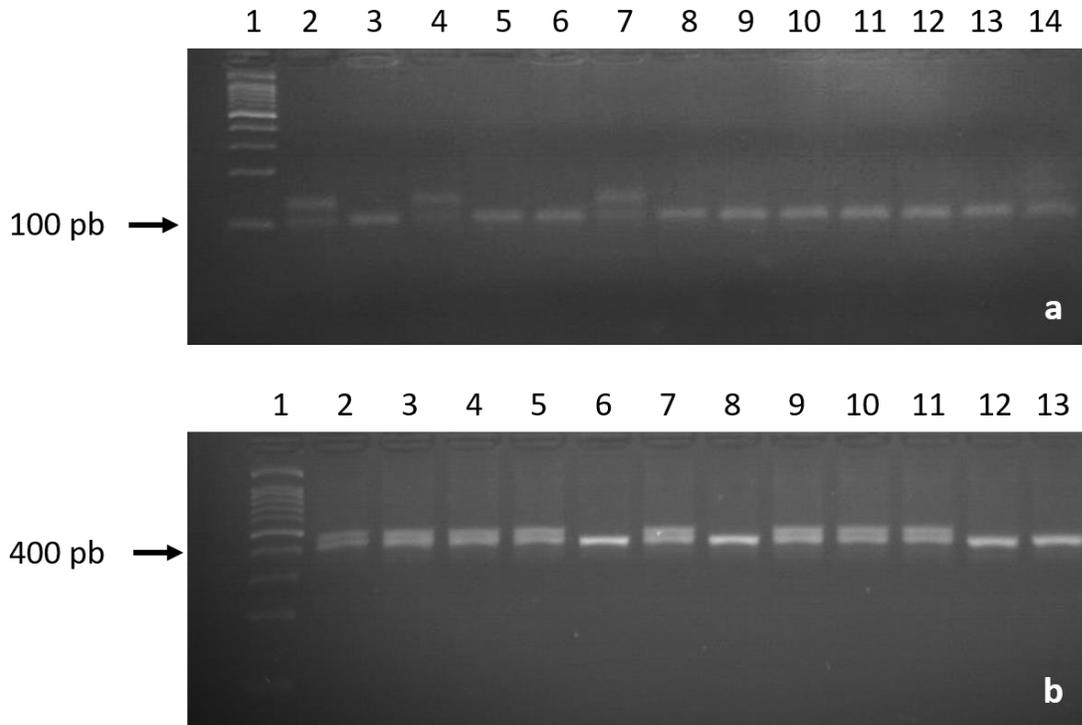


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de los productos de PCR para el gen *PRNP* bovino. A) Genotipos para la indel23pb. Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb. Carriles 2, 4 y 7: Genotipos heterocigotas, fragmentos de 100 y 123pb. Carriles 3, 5, 6 y 8 al 14 genotipo homocigota para el alelo de delección de 23pb, fragmentos de 100pb. B) Genotipos para la indel12pb Carril 1: marcador de peso molecular de 100pb. Carriles 6, 8, 12 y 13: genotipos homocigotas para el alelo de delección de 12pb, fragmentos de 400pb. Carriles 2 al 5, 6 y 9 al 11: genotipos heterocigotas, fragmentos de 400 y 412pb.

Cuadro 1. Proporciones genotípicas y frecuencias alélicas para los polimorfismos indel12pb e indel23pb en bovinos Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian y Criollo Uruguayo.

Raza /indel	% Genotipos			Alelos		P valor			
	+/+	+/-	-/-	+	-	AA	AA x H	HF	CU
12pb (400-412)									
AA (n=76)	0	39	61	0.20	0.80	--	0.295	<0.01*	<0.00001*
AA x H (n=22)	0	28	72	0.16	0.84	--	--	<0.01*	<0.00001*
HF(n=30)	17	50	33	0.42	0.58	--	--	--	0.17
CU (n=86)	29	52	19	0.55	0.45	--	--	--	--
23pb (100-123)									
AA (n=76)	5	33	62	0.22	0.78	--	0.195	0.12	<0.00001*
AA x H (n=22)	9	45	45	0.32	0.68	--	--	0.84	<0.01*
H F (n=30)	7	53	40	0.33	0.67	--	--	--	<0.001*
CU (n=86)	27	57	16	0.55	0.45	--	--	--	--

Nota: AA= Aberdeen Angus, AA x H= Aberdeen Angus x Hereford, HF= Holstein Friesian, CU= Criollo Uruguayo. +/+ : homocigota para la inserción; +/- heterocigota; -/- : homocigota para la delección; + : inserción, - : delección; P valor de la comparación entre razas, * $P < 0.05$. Test exacto de Fisher para equilibrio de Hardy-Weinberg en todas las razas: indel12pb, $P > 0.05$; indel23pb, $P > 0.05$.

Cuadro 2. Comparación de las frecuencias alélicas para los polimorfismos indel12pb e indel23pb en las razas estudiadas con otras poblaciones de las mismas razas reportadas en la bibliografía consultada.

Raza	País*	N	Indel12pb		Indel23pb		Referencia
			+	-	+	-	
Aberdeen Angus	CN	30	0.37	0.63	0.22	0.78	Zhu et al. (2008)
Aberdeen Angus	BR	99	0.44	0.56	0.27	0.73	Kerber et al. (2008)
Aberdeen Angus	BR	26	0.54	0.46	0.19	0.81	Sanches et al. (2016)
Aberdeen Angus	UY	76	0.2	0.8	0.22	0.78	Presente studio
Aberdeen Angus x Hereford	UY	22	0.16	0.84	0.32	0.68	Presente studio
Caracú	BR	40	0.7	0.3	0.72	0.28	Galvão et al. (2012)
Criollo Uruguayo	UY	86	0.55	0.45	0.55	0.45	Presente studio
Franqueiro	BR	73	0.33	0.67	0.36	0.64	Kerber et al. (2008)
Hereford	CN	30	0.12	0.88	0.02	0.98	Zhu et al. (2008)
Holstein Friesian	UK	276	0.37	0.63	0.29	0.71	Juling et al. (2006)
Holstein Friesian	JP	863	0.26	0.74	0.21	0.79	Nakamitsu et al. (2006)
Holstein Friesian	JP	65	0.58	0.42	0.45	0.55	Msalya et al. (2009)
Holstein Friesian	KR	52	0.38	0.62	0.3	0.7	Jeong et al. (2006)
Holstein Friesian	DE	66	0.47	0.53	0.42	0.58	Kashkevich et al. (2007)
Holstein Friesian	DE	313	0.47	0.53	0.38	0.62	Juling et al (2006)
Holstein Friesian	DE	80	0.34	0.66	0.33	0.67	Hasse et al. (2007)
Holstein Friesian	US	690	0.47	0.53	0.43	0.57	Brunelle et al. (2008)
Holstein Friesian	PL	510	0.45	0.55	0.36	0.64	Strychalsky et al. (2012)
Holstein Friesian	PL	651	0.48	0.52	0.38	0.62	Gurgul et al. (2012)
Holstein Friesian	UY	30	0.42	0.58	0.33	0.67	Presente studio

Nota. +: inserción; -: deleción. CN: China, BR: Brasil, UY: Uruguay, UK: Reino Unido, JP: Japón, KR:

Corea del Sur, DE: Alemania, US: Estados Unidos, PL: Polonia.

Cuadro 3. Distribución de haplotipos para los polimorfismos indel12pb e indel23pb del gen PRNP en Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian y Criollo Uruguayo.

Haplotipo	N° de cromosomas			Frec.	P valor			
	n	n*	N		AA	AA x H	HF	CU
AA (n=76)					--	0.37	<0.0001*	<0.0001*
12ins-23ins	0	0	0	0				
12ins-23del	9	21	30	0.20				
12del-23ins	12	21	33	0.22				
12del-23del	89	0	89	0.58				
AA x H (n=22)					--	--	<0.0001*	<0.0001*
12ins-23ins	0	0	0	0				
12ins-23del	1	6	7	0.16				
12del-23ins	8	6	14	0.32				
12del-23del	23	0	23	0.52				
HF (n=30)					--	--	--	0.04*
12ins-23ins	6	12	18	0.3				
12ins-23del	6	1	7	0.12				
12del-23ins	1	1	2	0.03				
12del-23del	21	12	33	0.55				
CU (n=86)					--	--	--	--
12ins-23ins	47	43	90	0.52				
12ins-23del	4	1	5	0.03				
12del-23ins	4	1	5	0.03				
12del-23del	29	43	72	0.42				

Nota: n* Estimado en base al número de animales doble heterocigotas. Frec.: frecuencia. AA= Aberdeen Angus, AA x H= Aberdeen Angus x Hereford, HF= Holstein Friesian, CU= Criollo Uruguayo. P valor de la comparación entre razas.

Cuadro 4. Valores de D , D' y r^2 para el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos indel12pb e indel23pb en las cuatro razas estudiadas.

Raza	D	D'	R^2	P valor
Aberdeen Angus	-0.044	-1	0.071	0.001*
Aberdeen Angus x Hereford	-0.051	-1	0.091	0.045*
Holstein Friesian	0.161	0.84	0.49	<0.00001*
Criollo Uruguayo	0.217	0.88	0.774	<0.00001*

Cuadro 5: Distribución de diplotipos para los polimorfismos indel12pb e indel23pb del gen PRNP en Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford, Holstein Friesian y Criollo Uruguayo.

Genotipo	Aberdeen Angus (n=76)	Aberdeen Angus x Hereford (n=22)	Criollo Uruguayo (n=86)	Holstein Friesian (n=30)
12ins-23ins / 12ins-23ins	0	0	0.27 (23)	0.06 (2)
12ins-23ins / 12ins-23del	0	0	0.012 (1)	0.06 (2)
12ins-23ins / 12del-23ins	0	0	0	0
12ins-23ins / 12del-23del	0	0	0.5 (43)	0.4 (12)
12del-23del / 12del-23del	0.5 (38)	0.41 (9)	0.14 (12)	0.3 (9)
12del-23del / 12del-23ins	0.05 (4)	0.1 (4)	0.05 (4)	0.03 (1)
12del-23del / 12in-23del	0.12 (9)	0.04 (1)	0.012 (1)	0.06 (2)
12ins-23del / 12ins-23del	0	0	0.012 (1)	0.03 (1)
12ins-23del / 12del-23ins	0.28 (21)	0.27 (6)	0.012 (1)	0.03 (1)
12del-23ins / 12del-23ins	0.05 (4)	0.09 (2)	0	0

Nota: Los diplotipos en negrita fueron estimados en base a los animales doble heterocigotas.

CONCLUSIONES

- Al igual que en otras razas antiguas y poco seleccionadas, el Criollo Uruguayo presenta una mayor proporción de alelos y haplotipos de inserción, relacionados a una mayor resistencia genética a la cEEB, lo que podría revalorizarlo como recurso zoogenético.
- Las razas comerciales estudiadas presentan una distribución desfavorable de los marcadores indel12pb e indel23pb en lo que respecta a la susceptibilidad a la enfermedad (según la literatura consultada), pero que no sería diferente a lo reportado internacionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Cidec, Facultad de Veterinaria; CSIC, Udelar y PEDECIBA, Udelar por la financiación de este trabajo.

LITERATURA CITADA

1. Armstrong E, Fila D, Boggio JC, Aragunde R, Saravia F, Isaurralde A, Artigas R, Vila F, Luzardo S, Brito G, Evia G, Dattele G. 2021. Análisis preliminar de crecimiento, calidad de la canal y de la carne de novillos Criollo Uruguayo en comparación con novillos Hereford. ALPA. 29(3-4): 181-190. <https://doi.org/10.53588/alpa.293410>
2. Brunelle BW, Greenlee JJ, Seabury CM, Brown CE, Nicholson EM. 2008. Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite cattle. BMC Vet. Res. 4(1): 36. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-36>
3. Clawson ML, Heaton MP, Keele JW, Smith TP, Harhay GP, Laegreid WW. 2006. Prion gene haplotypes of U.S. cattle. BMC genetics. 7, 51.
4. Czarnik U, Grzybowski G, Zabolewicz T, Strychalski J, Kaminski S. 2009. Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish Red cattle, Polish White-backed cattle

- and European bison (*Bison bonasus* L., 1758). *Russ. J. Genet.* 45(4): 453-459. <https://doi.org/10.1134/S1022795409040103>
5. Galvão CE, Rosinha GMS, Sanches CC, Elisei C, Araújo FR, Feijó GLD, Soares CO. 2012. Polymorphisms of intron 1 and the promoter region at the PRNP gene in BSE-free Caracu cattle. *Biochem. Genetics* 50:657-669. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9508-2>
 6. Geldermann H, He H, Bobal P, Bartenschlager H, Preuss S. 2006. Comparison of DNA variants in the PRNP and NF1 regions between bovine spongiform encephalopathy and control cattle. *Anim. Genet.* 37, 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01519.x>
 7. Gurgul A, Polak MP, Larska M, Słota E. 2012. PRNP and SPRN genes polymorphism in atypical bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in Polish cattle. *J. Appl. Genet.* 53(3): 337-342. <https://doi.org/10.1007/s13353-012-0102-4>
 8. Green M, Sambrook J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual*. En: (4th Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2028 p.
 9. Haase B, Doherr M, Seuberlich T, Drögemüller C, Dolf G, Nicken P, Schiebe K, Ziegler U, Groschup M, Zurbriggen A, Leeb T. 2007. PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet.* 8:15. <https://doi.org/10.1007/s13353-012-0102-4>
 10. Hreško S, Mojžiš M, Tkáčiková L. 2009. Prion protein gene polymorphism in healthy and BSE-affected Slovak cattle. *J. Appl. Genet.* 50(4): 371–374. <https://doi.org/10.1007/BF03195695>
 11. Iannuzzi L, Palomba R, Di Meo GP, Perucatti A, Ferrara L. 1998. Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 81(3-4): 202-204. <https://doi.org/10.1159/000015030>
 12. Jeong BH, Lee YJ, Kim NH, Carp RI, Kim YS. 2006. Genotype distribution of the prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms in Korean cattle. *Genome.* 49(12): 1539-1544. <https://doi.org/10.1139/g06-110>

13. Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, Fries R. 2006. A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol.* 4(1): 33. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-33>
14. Kashkevich K, Humeny A, Ziegler U, Groschup MH, Nicken P, Leeb T, Fischer C, Becker C, Schiebel K. 2007. Functional relevance of DNA polymorphisms within the promoter region of the prion protein gene and their association to BSE infection. *FASEB. J.* 21(7): 1547-1555. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7522com>
15. Kerber AR, Hepp D, Passos DT, de Azevedo Weimer T. 2008. Polymorphisms of two indels at the PRNP gene in three beef cattle herds. *Biochem. Genet.* 46(1-2): 1-7. <https://doi.org/10.1007/s10528-007-9113-y>
16. Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, Hur MW. 2002. POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J. Biol. Chem.* 277: 26761-26768. <https://doi.org/10.1074/jbc.m202078200>
17. Lewontin RC. 1988. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, 120(3): 849-852.
18. Murdoch BM, Clawson ML, Yue S, Basu U, McKay S, Settles M, Capoferri R, Laegreid WW, Williams JL, Moore SS. 2010. PRNP haplotype associated with classical BSE incidence in European Holstein cattle. *PLoS One*, 5(9): e12786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012786>
19. Morrell P, Toleno M, Lundy K, Clegg M. 2005. Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilization. *PNAS*. 102 (7) 2442-2447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409804102>
20. Msalya G, Shimogiri T, Okamoto S, Kawabe K, Minezawa M, Namikawa T, Maeda Y. 2009. Gene and haplotype polymorphisms of the Prion gene (PRNP) in Japanese Brown, Japanese native and Holstein cattle. *Anim. Sci. J.* 80(5): 520-527. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00669.x>
21. Nakamitsu S, Miyazawa T, Horiuchi M, Onoe S, Ohoba Y, Kitagawa H, Ishiguro N. 2006. Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J. Vet. Med. Sci.* 68(1): 27-33. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.27>

22. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). [Internet], [23 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-sobre-eeb/>
23. Raymond M, Rousset F. 1995. Genepop (Version 1.2): Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>
24. Sanches CC, Rosinha G, Galvão CE, Feijó GL, Araújo FR, Soares CO. 2016. Polymorphisms in the Prion Protein Gene of cattle breeds from Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 36(11): 1059-1066. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016001100001>
25. Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, Leeb T. 2004. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics.* 5(1): 19-25. <https://doi.org/10.1007/s10048-003-0171-y>
26. Sander P, Hamann H, Drögemüller C, Kashkevich K, Schiebel K, Leeb T. 2005. Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem.* 280(45): 37408-37414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506361200>
27. Vernerova K, Tothova L, Mikova A, Vodrazka P, Simek B, Hanusova L, Citek J. BSE-associated polymorphisms in the prion protein gene: an investigation. *J Anim Breed Genet.* 2014. 131(5):403-8. <https://doi.org/10.1111/jbg.12090>
28. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128(9): 199-203. <https://doi.org/10.1136/vr.128.9.199>
29. Yang Q, Zhang S, Liu L, Lei C, Qi X, Lin F, Qu W, Qi X, Liu J, Wang R, Chen H, Lan X. The evaluation of 23-bp and 12-bp insertion/deletion within the PRNP gene and their effects on growth traits in healthy Chinese native cattle breeds. *J App An Res.* 2018;46(1):505–511 <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1348950>

30. Zhu, XY, Feng FY, Xue SY, Hou T, Liu HR. 2011. Bovine spongiform encephalopathy associated insertion/deletion polymorphisms of the prion protein gene in the four beef cattle breeds from North China. *Genome*. 54(10): 805-811. <https://doi.org/10.1139/g11-043>

**III. DISTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS INDEL23PB E INDEL12PB DEL GEN
PRNP BOVINO Y SU EFECTO SOBRE CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS
CÁRNICO EN LA RAZA ABERDEEN ANGUS DE URUGUAY**

Rody Artigas^{a*}, Eugenio Jara^a, Silvia Llambí^a, Eileen Armstrong^a.

*^aUnidad Académica de Genética y Mejora Animal. Departamento de Producción Animal y Salud
de los Sistemas Productivos. Facultad de Veterinaria-Udelar.*

*LasPlaces 1550, Montevideo Uruguay. Tel.: +59826285802, rodyartigas@gmail.com

Distribución de los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* bovino y su efecto sobre características de interés cárnico en la raza Aberdeen Angus de Uruguay.

RESUMEN

Los alelos de delección en los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* bovino se han asociado con la susceptibilidad a la encefalopatía espongiforme bovina. Este trabajo evalúa la distribución de esos polimorfismos en la raza Aberdeen Angus de Uruguay y su posible asociación con características de interés cárnico. Se analizaron 635 animales de diferentes orígenes, alimentados a pastoreo o *feedlot*, con registros para: peso en segunda balanza, longitud de la canal, color (L,a,b), fuerza de corte (24hs y 10 días), pérdidas por cocción (24hs y 10 días) y porcentaje de lípidos (%). Se calcularon las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y diplotípicas para el gen *PRNP*. La Asociación genotipo-fenotipo se realizó mediante regresión lineal múltiple considerando los efectos fijos del genotipo, sexo, y tropa. Se observó una alta frecuencia de los alelos (D23=0.76, D12=0.67) y haplotipo (D23-D12=0.68) de delección. Los animales de *feedlot* con genotipo DD presentaban canales más largas que los II (indel23pb: $P=0.002$; indel12pb=0.02). El porcentaje de grasa intramuscular fue mayor en los animales DD alimentados a pastoreo (indel23pb: $P=0.016$; indel12pb: $P=0.043$) y en los animales de *feedlot* (solo para indel23pb: $P=0.02$). En los animales II alimentados a pastoreo, la fuerza de corte a los 10 días tendió a ser mayor (indel23pb $P=0.088$). Estos resultados indican que los dos indels pueden afectar características de la canal y la carne y podrían ser utilizados para seleccionar animales desde un punto de vista sanitario o productivo.

Palabras clave: prion, calidad de la carne, encefalopatía espongiforme bovina.

ABSTRACT

Deletion alleles in the indel23pb and indel12pb polymorphisms of the bovine PRNP gene have been associated with susceptibility to bovine spongiform encephalopathy. This work evaluates the distribution of these polymorphisms in the Uruguayan Aberdeen Angus breed and its possible association with characteristics of meat interest. 635 animals of different origins were analyzed, fed to grazing or feedlot, with records for: second scale weight, carcass length, color (L, a, b), shear force (24 hours and 10 days), cooking losses (24 hours and 10 days) and lipid percentage (%). Allele, genotypic, haplotype, and diplotypic frequencies were calculated for the PRNP gene. The genotype-phenotype association was performed by multiple linear regression considering the fixed effects of genotype, sex, and troop. A high frequency of the deletion alleles (D23 = 0.76, D12 = 0.67) and haplotype (D23-D12 = 0.68) was observed. Feedlot animals with genotype DD had longer channels than II (indel23pb: $P = 0.002$; indel12pb = 0.02). The percentage of intramuscular fat was higher in grazing fed DD animals (indel23pb: $P = 0.016$; indel12pb: $P = 0.043$) and in feedlot animals (only for indel23pb: $P = 0.02$). In the II animals fed grazing, the shear force at 10 days

tended to be higher (indel23pb $P = 0.088$). These results indicate that the two indels can affect carcass and meat characteristics and could be used to select animals from a sanitary or productive point of view.

Key words: prion, meat quality, bovine spongiform encephalopathy.

INTRODUCCIÓN

La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva de los bovinos, perteneciente a la familia de las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) junto al Scrapie de los ovinos y caprinos y la enfermedad de Creutzfeldt Jacobs de los humanos, entre otras. Una característica común a las TSEs es la acumulación en el sistema nervioso central de una isoforma protéica patológica (PrP^{Sc}), generada por modificaciones postraduccionales de la proteína prion celular (PrP^C) codificada por el gen *PRNP* del huésped [1].

Polimorfismos en el gen *PRNP* han demostrado modular la susceptibilidad a las TSEs en ratones [2, 3], ovinos [4], caprinos [5], ciervos [6, 7], y humanos [8]. Particularmente en los bovinos, se ha comunicado que dos polimorfismos del tipo inserción/delección (indel) son capaces de afectar la susceptibilidad de los animales a la forma clásica de la BSE (cEEB). El primero de ellos es un indel de 23pb en la región promotora del gen [9] y el segundo un indel de 12pb en el intrón 1 [10].

Análisis *in silico* demostraron que la inserción de 23pb en el promotor representa un sitio de unión para la proteína represora RP58, mientras que la inserción de 12pb en el intrón 1 actúa ofrece un sitio de unión para la proteína específica 1 (SP1) [11]. De esta manera, cuando los dos alelos de inserción están presentes (haplotipo 12in-23in), RP58 ejercería su efecto represor mediante la interacción con SP1 [12]. En contraposición, el haplotipo 12del-23del llevaría fallas reguladoras en el gen produciendo mayores niveles de expresión [11]. Al comparar animales sanos con animales afectados por cEEB, se ha observado que el haplotipo 12del-23del es más frecuente en los animales enfermos que en los sanos [13, 14, 15, 16].

La descripción de la dinámica poblacional de los polimorfismos indel23pb e indel12pb ha sido establecida en varias poblaciones bovinas a nivel internacional. Sin embargo, la información disponible para la raza Aberdeen Angus aún es limitada, habiéndose reportado en un reducido grupo de animales de Brasil [17, 18] y de China [19].

Aún no es claro el efecto que los polimorfismos del gen *PRNP* podrían tener sobre caracteres de interés productivo en los bovinos. Algunos autores han reportado la asociación de las indel23pb e indel12pb con caracteres de producción de leche en la raza Jersey [20], con características de crecimiento en razas bovinas nativas de China [21], así como con características de calidad espermática en toros Holstein Friesian [22].

En este contexto, el gen *PRNP* bovino podría ser un marcador molecular de interés desde un punto de vista sanitario y productivo, sin embargo, los estudios aún son escasos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la dinámica poblacional de los polimorfismos indel-23pb e indel-12pb en el gen *PRNP* en bovinos Aberdeen Angus de Uruguay (AAU) y evaluar su posible asociación con características de interés cárnico en la raza.

RESULTADOS

Frecuencias genotípicas y alélicas para las indel-23pb e indel-12pb del gen PRNP bovino.

La frecuencia genotípica y alélica para las indel-23pb e indel-12pb se muestran en la tabla 1. Ambos marcadores demostraron ser polimórficos, con una frecuencia mayoritaria de los alelos de delección (D) respecto a los de inserción (I). En relación a la distribución de genotipos, en ambos marcadores se observaron los tres genotipos posibles (DD; DI; II), con una elevada proporción de animales homocigotas DD. Para el polimorfismo indel-23pb el genotipo DD fue el mayoritario con una frecuencia de 0.586, mientras que para el polimorfismo indel-12pb la frecuencia del genotipo DD fue de 0.451, resultando coincidente con la frecuencia del genotipo DI. Ambos marcadores se encontraron en equilibrio génico de Hardy-Weinberg ($P>0.05$) (tabla 1).

Frecuencias haplotípicas y diplotípicas para las indel-23pb e indel-12pb del gen PRNP bovino.

Se detectaron los cuatro haplotipos posibles (D23-D12; I23-I12; D23-I12, I23-D12), producto de la combinación de los alelos de ambos polimorfismos. La frecuencia de los haplotipos se muestra en figura 1a. El haplotipo mayoritario fue D23-D12, seguido de I23-I12. Los dos haplotipos restantes fueron minoritarios, siendo particularmente rara la forma haplotípica I23-D12, que se observó en menos del 1% de la población estudiada. En relación al análisis de desequilibrio de ligamiento, los valores de D' y R^2 se muestran en la figura 2; ambos marcadores demostraron estar fuertemente ligados ($P<0.001$).

De los 10 diplotipos posibles para ambos marcadores, en este trabajo se detectaron ocho (figura 1b). Se observó una clara predominancia de los genotipos D23-D12/D23-D12 y D23-D12/I23-I12. Los diplotipos I23-D12/D23-D12 y D23-I12/D23-I12 fueron particularmente menos frecuentes.

Asociación de los polimorfismos indel-23pb e indel12pb con características de interés cárnico

Se realizaron las asociaciones de los genotipos para los marcadores indel23pb e indel12pb con las características de interés cárnico en los animales alimentados a pastoreo (tabla 2) y en los animales alimentados a *feedlot* (tabla 3). En los animales alimentados a pastoreo, para el marcador indel23pb se observó que los individuos de genotipo II presentaban una tendencia a mayor fuerza de corte a los 10 días (menor terneza) ($P=0.088$). Para el mismo marcador, los animales de genotipo II presentaban un menor

porcentaje de lípidos que los animales de genotipo DD ($P=0.016$). En lo que respecta al marcador *indel12pb* solo se vio asociado con el porcentaje de lípidos, siendo los animales de genotipo DD superiores a los II y a los DI ($P=0.043$ y $P=0.038$ respectivamente).

En los animales alimentados a *feedlot*, para el marcador *indel23pb*, se observó que los individuos de genotipo II presentaban una menor longitud de la canal en relación a los de genotipo DD y DI ($P=0.008$ y $P=0.002$ respectivamente). A su vez, los animales II presentaron un menor porcentaje de lípidos que los DD ($P=0.021$), con una tendencia similar respecto a los DI ($P=0.0503$). En lo que respecta al marcador *indel12pb*, los animales de genotipo II presentaron una menor longitud de la canal que los animales DI ($P=0.012$), con una tendencia similar respecto a los animales DD ($P=0.07$). Los individuos de genotipo II presentaron una tendencia a menor porcentaje de lípidos respecto a los animales de genotipo DD ($P=0.07$).

DISCUSIÓN

Este trabajo analiza la distribución de los polimorfismos *indel23pb* e *indel12pb* del gen *PRNP* bovino en la raza Aberdeen Angus de Uruguay, y su relación con características de interés cárnico. Para nuestro conocimiento, es la mayor muestra poblacional de la raza analizada y el primer reporte de asociación del gen *PRNP* con caracteres de calidad de la carne y la canal en bovinos.

Distribución de los polimorfismos Indel23pb e indel12pb en AAU

Los alelos de delección de 23pb en el promotor y de 12pb en el intrón 1 del gen *PRNP* bovino, han sido relacionados con una mayor susceptibilidad genética a la forma clásica de la EEB (cEEB) [9, 11, 24, 13, 33, 34, 16]. En los animales analizados en este trabajo, se observó una frecuencia mayoritaria de los alelos de delección ($D23=0.763$; $D12=0.676$) respecto a los de inserción ($I23=0.236$; $I12=0.323$) (tabla 1). Estas frecuencias alélicas son concordantes para la raza Aberdeen Angus en Brasil [17] y en China [19]. Otros autores comunican en Brasil una elevada frecuencia del alelo D23, sin embargo, encuentran una frecuencia menor para el alelo D12 [18] (fig. 1 a, b).

La frecuencia de los alelos de delección para ambos polimorfismos coincide con gran parte de los trabajos realizados en diferentes razas de *Bos taurus*, dónde resulta mayoritaria respecto a la de los alelos de inserción (fig. 1 a, b). Contrario a esto, en algunas razas más antiguas se ha observado una mayor frecuencia de los alelos de inserción, como en Braunvieh [14], German Brown [24, 13]; Swiss Brown y Swiss Schwarzfleck [13] (fig. 1 a, b). En este sentido, se ha planteado que los alelos de delección tienden a ser menos frecuentes en las razas primitivas, menos seleccionadas [16].

En lo que respecta a las frecuencias genotípicas, para el marcador *indel23pb*, el genotipo DD fue el más abundante (0.586). De igual manera, para el *indel12pb*, se observó una alta frecuencia de animales DD

(0,451), que resultó coincidente con la de animales DI (tabla1). Distribuciones genotípicas similares, para ambos marcadores, han sido comunicadas para la raza Aberdeen Angus anteriormente, incluyendo alta frecuencia del genotipo DI para el indel12pb [17, 19, 18]. Los genotipos DD para ambos marcadores demostraron estar sobrerrepresentados en los animales afectados por cEEB, en comparación a animales sanos [9, 11, 24, 13, 16], por lo que la raza AAU presentaría una distribución de genotipos desfavorable en este sentido.

En los animales AAU se observaron todas las formas haplotípicas, siendo mayoritario el haplotipo D23-D12 (fig. 2a). Resultados similares fueron comunicados para la raza con anterioridad en Brasil [17] y en China [19], así como en la raza Fleckvieh [24, 13, 19, 16], Hanwoo [35, 36, 37], Hereford [19], Holstein Friesian [24, 35, 38, 13, 39, 40, 16], Kuchinoshima [40] y Japanese Black [41]. Resultados opuestos pueden encontrarse en algunas razas antiguas como Braunvieh [14], German Brown [24, 13], Swiss Brown y Swiss Schwarzfleck [13], dónde la frecuencia del haplotipo I23-I12 supera el 50%.

Estudios previos han asociado a los haplotipos I23-I12 con una mayor resistencia genética a la cEEB, y al haplotipo D23-D12 con una mayor susceptibilidad [9, 11, 24, 13, 16]). En este sentido, la distribución de haplotipos en AAU parecería desfavorable, sin embargo, no es muy diferente a la situación de la mayoría de las razas *Bos taurus* estudiadas. Los haplotipos I23-D12 y D23-I12 fueron menos frecuentes en AAU, esto puede deberse a la cercanía física de ambos polimorfismos (<2 Kbp) [39] y a que ambos marcadores demostraron estar fuertemente ligados en AAU ($D' = 0.99$; $P < 0.001$; $R^2 = 0,64$) (Fig. 3).

De los 10 diplotipos posibles para los polimorfismos indel23pb e indel12pb se observaron ocho en UAA. El más frecuente fue D23-D12/D23-D12 seguido de I23-I12/D23-D12, al igual que reportan estudios previos en la raza [17, 19], así como en otras razas *Bos taurus* como Hereford [19], Fleckvieh [24, 19] y Holstein Friesian [24]. Los diplotipos que sólo presentan alelos de delección (D23-D12/D23-D12) se han visto sobrerrepresentados en los animales afectados con cEEB. Estudios anteriores han demostrado que los animales con ese diplotipo son más susceptibles genéticamente a la cEEB (1.76 a 2.68 veces más) que los animales de diplotipo I23-I12/ I23-I12 [24, 13]. En este sentido, los animales AAU también presentan una distribución desfavorable de diplotipos.

Asociación de los polimorfismos indel23pb e indel12pb con características de la canal y la carne.

La potencialidad de selección a favor de los genotipos más resistentes a la cEEB en casos de reemergencia de la enfermedad ha sido propuesta con anterioridad [24], aunque poco se conoce sobre su efecto directo o indirecto en los fenotipos de interés económico. Existen algunas evidencias que muestran asociación del gen *PRNP* con caracteres de interés productivo en ovinos [42-44], caprinos [45] y en bovinos para características conformacionales, producción de leche y calidad seminal [20-22]. Sin embargo, los

trabajos aún son escasos para las características de la canal y la carne. En este trabajo analizamos 10 características de calidad de la canal y la carne en bovinos AAU, encontrando diferencias significativas de acuerdo al genotipo de los polimorfismos indel23pb e indel12pb en 3 de ellas.

En los animales alimentados a *feedlot* observamos que los genotipos DD y DI para el marcador indel23pb y DI para el marcador indel12pb presentaban asociación con la longitud de la canal. En la raza bovina Nanyang se ha observado que los animales de genotipo DD para el marcador indel23pb presentaban un largo corporal *in vivo* mayor al de los animales de genotipo II [21]. En una línea similar, se ha comunicado en ovinos un efecto del genotipo de *PRNP* sobre la longitud de la canal [42] y la ganancia de peso diario [43]. Algunos autores han reportado asociación del gen *PRNP* con diferentes características morfométricas en varias razas nativas de China, incluyendo el peso corporal [21]. En nuestro trabajo no encontramos diferencias relativas al peso de la canal en segunda balanza, para ninguno de los dos marcadores moleculares estudiados, si bien para el marcador indel12pb se observó una tendencia en ese sentido.

En los animales alimentados a pastoreo el genotipo DD para el marcador indel23pb se observa asociado a un mayor porcentaje de lípidos en el músculo *Longissimus dorsi* que en los animales de genotipo II. Una tendencia similar fue observada en los animales alimentados a *feedlot*. De igual forma, los animales alimentados a pastoreo de genotipo DD para el marcador indel12pb presentaron un mayor porcentaje de lípidos que los II y los DI. El efecto del gen *PRNP* sobre el porcentaje de lípidos intramusculares ya fue reportado con anterioridad en la raza ovina Romanov, donde el genotipo ARR de resistencia al Scrapie se relacionaba con un menor nivel de marbling o menor porcentaje de lípidos en el músculo *Longissimus dorsi* [42]. Sumado a esto, se observó en bovinos raza Jersey que los animales de Genotipo DD para el marcador indel23pb producían leche con un mayor contenido de grasa que los de genotipo II [20].

Se han comunicado fuertes huellas de selección en el cromosoma bovino BTA13, con dos genes localizados dentro la región: *PRNP* y *PRND* (*doppel prion protein*) [46]. Otros autores, en la misma región, también encontraron huellas de selección, identificando al gen *CDS2* (*CDP-diacylglycerol synthase*), relacionado con la biosíntesis de fosfolípidos [47]. Estas huellas de selección podrían ser un efecto directo o indirecto de la selección artificial o natural sobre esa región cromosómica [46].

La participación del gen *PRNP* en rutas metabólicas adipogénicas ha sido propuesta anteriormente en ratones, observándose que la PrP^C modula el nivel de lípidos en los adipocitos, regulando negativamente las vías de autofagia [48]. Además, se ha demostrado la importancia de PrP^C en el metabolismo lipídico hepático, dónde la disminución de la expresión de *PRNP* lleva a un aumento en el depósito intracelular de lípidos [49], así como a resistencia a la insulina y obesidad [50].

El porcentaje de lípidos intramusculares es uno de los factores que afectan la fuerza de corte de la carne, siendo éste un atributo de gran importancia para los consumidores. En la medida que los lípidos se calientan, colaboran en mantener la jugosidad de la carne, en solubilizar el colágeno y ejercer un efecto lubricante en la masticación [51]. Pero, además, un mayor porcentaje de lípidos se correlaciona con una mayor terneza (menor fuerza de corte) [52]. En los animales AAU alimentados a pasto de genotipo DD, para el marcador indel23pb, se observó una tendencia a presentar una menor fuerza de corte a los 10 días que para los animales II. Esto podría explicarse por el hecho de que esos mismos animales presentaron un mayor porcentaje de lípidos.

En resumen, la raza UAA presenta una alta frecuencia de los genotipos DD para ambos marcadores, al igual que varias razas comerciales altamente seleccionadas. Si bien la distribución de genotipos, haplotipos y diplotipos no parecería ser favorable en lo que respecta a la susceptibilidad genética a la cEEB, podrían tener un efecto significativo sobre características de interés productivo como longitud de la canal, y porcentaje de lípidos intramusculares. Esto ofrece potencialidad de selección sobre el gen *PRNP* desde el punto de vista sanitario o productivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y genotipado

Se seleccionaron 643 muestras de ADN genómico de animales de la raza Aberdeen Angus (novillos n=468, vacas n=138 y vaquillonas n=38) pertenecientes al banco de ADN de la Unidad Académica de Genética y Mejora Animal de la Facultad de Veterinaria, Udelar. Las muestras de ADN habían sido extraídas previamente a partir de sangre entera periférica [23]. Los animales habían sido muestreados al azar y pertenecían a 10 tropas diferentes, provenientes de 4 departamentos del país (Salto, Florida, Paysandú y Tacuarembó). Los animales habían sido criados en feedlot (engorde a corral con alimentos balanceados) o en ganadería extensiva a pastoreo sin suplementación con ración.

La concentración de cada muestra de ADN fue medida mediante espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, USA) y estandarizada a una concentración de 50ng/μL). La información de la secuencia del gen *PRNP* fue obtenida de GenBank (número de acceso AJ298878). Para el genotipado se contrataron los servicios de la empresa Gene Seek® (www.geneseek.com), y fue realizado mediante la estrategia *custom assay genotyping* basada en espectrometría de masa, utilizando la primera base de la inserción y la primera base luego de la inserción como referencia de los alelos de inserción y delección respectivamente [24].

Características fenotípicas de la canal y la carne

Los animales muestreados contaban con registros fenotípicos para las siguientes características: peso de la canal a la segunda balanza (Kg), longitud de la canal (cm) y mediciones instrumentales en el músculo *Longissimus dorsi* de: color (coordenadas L*, a*, b*, [25]), porcentaje de lípidos intramusculares (% lípidos [26]), fuerza de corte a las 24h mediante la cizalla de Warner-Bratzler (Kg [27]), y pérdidas por cocción a los 10 días (% [27]). Para los animales alimentados a pastoreo se contaba además con datos de fuerza de corte a los 10 días de maduración y pérdidas por cocción a los 10 días.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas, así como la existencia de equilibrio de Hardy y Weinberg (mediante el test exacto de Fisher) se calcularon utilizando el software de acceso libre Genepop 4.2 [28] disponible en: http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html. Las frecuencias de los haplotipos y diplotipos fue calculada mediante conteo directo. Dado que se encontraron animales dobles heterocigotas, la frecuencia del diplotipo 23ins-12ins/23del-12del fue calculada a partir de la frecuencia de los haplotipos certeros según [29], utilizando la ecuación de probabilidad condicional:

$$P(23ins-12ins/23del-12del) = [P(23ins-12ins) \times P(23del-12del)] / [P(23ins-12ins) \times P(23del-12del)] + [P(23in-12del) \times P(23del-12in)]$$

El desequilibrio de ligamiento (D' y R^2) [30] se evaluó utilizando el programa de libre acceso SHEsis [31] disponible en <http://analysis.bio-x.cn>.

Para determinar la asociación genotipo-fenotipo se realizó un análisis de regresión lineal utilizando el programa GraphPad Prism 9. El análisis se realizó por separado para los animales alimentados a campo natural o a feedlot. El modelo general utilizado fue:

$$Y = \mu + \alpha + \beta + \gamma + e$$

dónde Y es la característica estudiada, μ es la media general de la característica, α es el efecto fijo del genotipo, β es el efecto fijo del sexo, γ es el efecto fijo de la tropa y e es el error aleatorio. Para las características pérdidas por cocción a los 10 días y fuerza de corte a los 10 días no se incluyó el efecto del sexo, puesto que los registros pertenecían sólo a novillos. Por iguales motivos, el sexo tampoco fue considerado en los animales alimentados a *feedlot*. Los datos de cada una de las características fenotípicas fueron normalizados mediante la tipificación estándar o mediante las transformaciones de BoxCox [32]. Un P valor menor a 0.05 fue considerado como significativo y $0.05 < P \leq 0.10$ tendencia.

Tabla 1. Frecuencias alélicas y genotípicas para los indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* bovino.

Genotipo	Indel23pb*		Indel12pb**	
	N	Frecuencia	N	Frecuencia.
II	37	0.058	63	0.098
ID	226	0.356	290	0.451
DD	372	0.586	289	0.451
Alelo	Frecuencia			
I	0.236		0.323	
D	0.763		0.676	

*Equilibrio de Hardy-Weinberg: * $\chi^2=0.118$, $P=0.95$; ** $\chi^2=0.625$, $P=0.87$

Tabla 2. Asociación entre los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* y características de interés cárnico en bovinos Aberdeen Angus alimentados a pastoreo ($M \pm SD$).

Característica	N	Genotipo Indel23pb			P* valor
		II (n)	ID (n)	DD (n)	
CW (Kg)	341	264 ± 42.24 (19)	252.2 ± 39,24 (136)	256.9 ± 39.07 (186)	0.994
CL (cm)	346	136.8 ± 6.594 (20)	137.1 ± 5.920 (137)	136.5 ± 6.095 (189)	0.944
L	312	33.79 ± 3.098 (20)	34.35 ± 3.616 (127)	34.88 ± 35.01 (165)	0.445
A	311	18.89 ± 4.959 (20)	18.19 ± 4.886 (127)	18.04 ± 5.026 (164)	0.772
B	312	9.662 ± 2.082 (20)	9.964 ± 2,641 (127)	10.24 ± 2.780 (165)	0.925
SF01 (Kgj)	307	3.44 ± 1.464 (18)	4.328 ± 2.193 (126)	4.481 ± 2.0415 (163)	0.770
SF10 (Kgj)	194	3.810 ± 1.404 (10)	3.394 ± 1.453 (87)	3.442 ± 1.469 (97)	0.088
CL01 (%)	283	0.275 ± 0.032 (16)	0.289 ± 0.036 (112)	0.295 ± 0.032 (155)	0.069
CL10 (%)	193	0.278 ± 0.023 (10)	0.274 ± 0.040 (86)	0.281 ± 0.036 (97)	0.572
LP (%)	307	3.013^a ± 1.814 (20)	3.349 ± 2.315 (125)	3.642^a ± 2.278 (162)	0.033
Genotipo Indel12pb					
CW (kg)	342	259.8 ± 40.69 (30)	258.3 ± 38.43 (158)	256.8 ± 39.39 (154)	0.717
CL (cm)	347	136.8 ± 6.290 (31)	136.8 ± 5.907 (160)	136.7 ± 5.783 (156)	0.596
L	314	34.18 ± 34.24 (31)	34.20 ± 3.547 (150)	35.04 ± 3.518 (133)	0.678
A	313	18.53 ± 4.584 (31)	18.30 ± 4.952 (150)	17.88 ± 5.082 (132)	0.707
B	314	9.990 ± 2.460 (31)	10.03 ± 2.623 (150)	10.26 ± 2.855 (133)	0.999
SF01 (Kgj)	306	3.755 ± 1.876 (29)	4.423 ± 2.191 (149)	4.378 ± 1.976 (128)	0.365
SF10 (Kgj)	196	3.594 ± 1.408 (16)	3.358 ± 1.390 (100)	3.460 ± 1.518 (80)	0.226
CL01 (%)	278	0.284 ± 0.034 (27)	0.289 ± 0.034 (128)	0.296 ± 0.033 (123)	0.325
CL10 (%)	193	0.271 ± 0.033 (15)	0.273 ± 0.038 (99)	0.282 ± 0.037 (79)	0.462
LP (%)	307	3.313^b ± 1.974 (29)	3.263^c ± 2.193 (29)	3.792^{bc} ± 2.391 (145)	0.041

CW: peso de la carcasa, CL: largo de la carcasa, SH01: fuerza de corte a las 24 horas post mortem, SF10: fuerza de corte a los 10 días post mortem, CL01: pérdidas por cocción a las 24 horas post mortem, CL10: pérdidas por cocción a los 10 días post mortem, LP: porcentaje de lípidos totales. ^aP*=0.016; ^bP*=0.043; ^cP*=0.038; P* valor para los datos normalizados.

Tabla 3. Asociación entre los polimorfismos indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* y características de interés cárnico en bovinos Aberdeen Angus alimentados en *feedlot* ($M \pm SD$).

Característica	N	Genotipos indel23pb			P* valor
		II (n)	ID (n)	DD (n)	
CW (kg)	256	275.8 \pm 14.33 (14)	275.3 \pm 27.15 (81)	275.3 \pm 21.65 (161)	0.229
CL (cm)	154	128.2^{ab} \pm 4.446 (6)	130.4^a \pm 5.314 (53)	130.2^b \pm 4.080 (95)	0.008
L	89	--	38.18 \pm 2.563 (31)	37.89 \pm 2.170 (58)	0.650
A	89	--	25.08 \pm 1.924 (31)	24.14 \pm 3.515 (58)	0.614
B	89	--	12.16 \pm 1.639 (31)	11.49 \pm 1.789 (58)	0.345
SF01 (Kgj)	51	--	3.193 \pm 0.667 (21)	3.168 \pm 0.593 (30)	0.888
CL01 (%)	48	--	0.282 \pm 0.015 (20)	0.279 \pm 0.016 (28)	0.587
LP (%)	305	3.392 ^{c‡} \pm 1.867 (20)	4.520 [‡] \pm 3.207 (117)	4.832 ^c \pm 2.958 (168)	0.060
Genotipos indel12pb					
CW (kg)	256	272.6 \pm 21.47 (27)	276.9 \pm 25.83 (115)	274.3 \pm 20.69 (114)	0.063
CL (cm)	153	128.6[‡] \pm 4.718 (13)	130.6^d \pm 4.952 (75)	130.1 [‡] \pm 4.0 (65)	0.037
L	89	37.45 \pm 3.610 (6)	37.94 \pm 2.446 (47)	37.27 \pm 2.129 (36)	0.680
A	89	25.47 \pm 3.300 (6)	24.74 \pm 2.460 (47)	23.88 \pm 3.710 (36)	0.161
B	89	11.62 \pm 1.701 (6)	11.84 \pm 1.682 (47)	11.58 \pm 1.890 (36)	0.946
SF01 (Kgj)	50	3.148 \pm 0.713 (3)	3.236 \pm 0.589 (28)	3.109 \pm 0.686 (19)	0.793
CL01 (%)	48	0.272 \pm 0.031 (3)	0.283 \pm 0.015 (27)	0.277 \pm 0.013 (18)	0.148
LP (%)	306	4.078 \pm 2.655 (33)	4.553 \pm 3.112 (144)	4.784 \pm 2.991 (129)	0.126

CW: peso de la carcasa, CL: largo de la carcasa, SF01: fuerza de corte a las 24 horas, CL01: pérdidas por cocción a las 24 horas, LP: porcentaje de lípidos. ^aP*=0.002; ^bP*=0.008; ^cP*=0.021; ^dP*=0.012, [‡]P*=0.0503, [†]P*=0.07. P* valor para los datos normalizados.

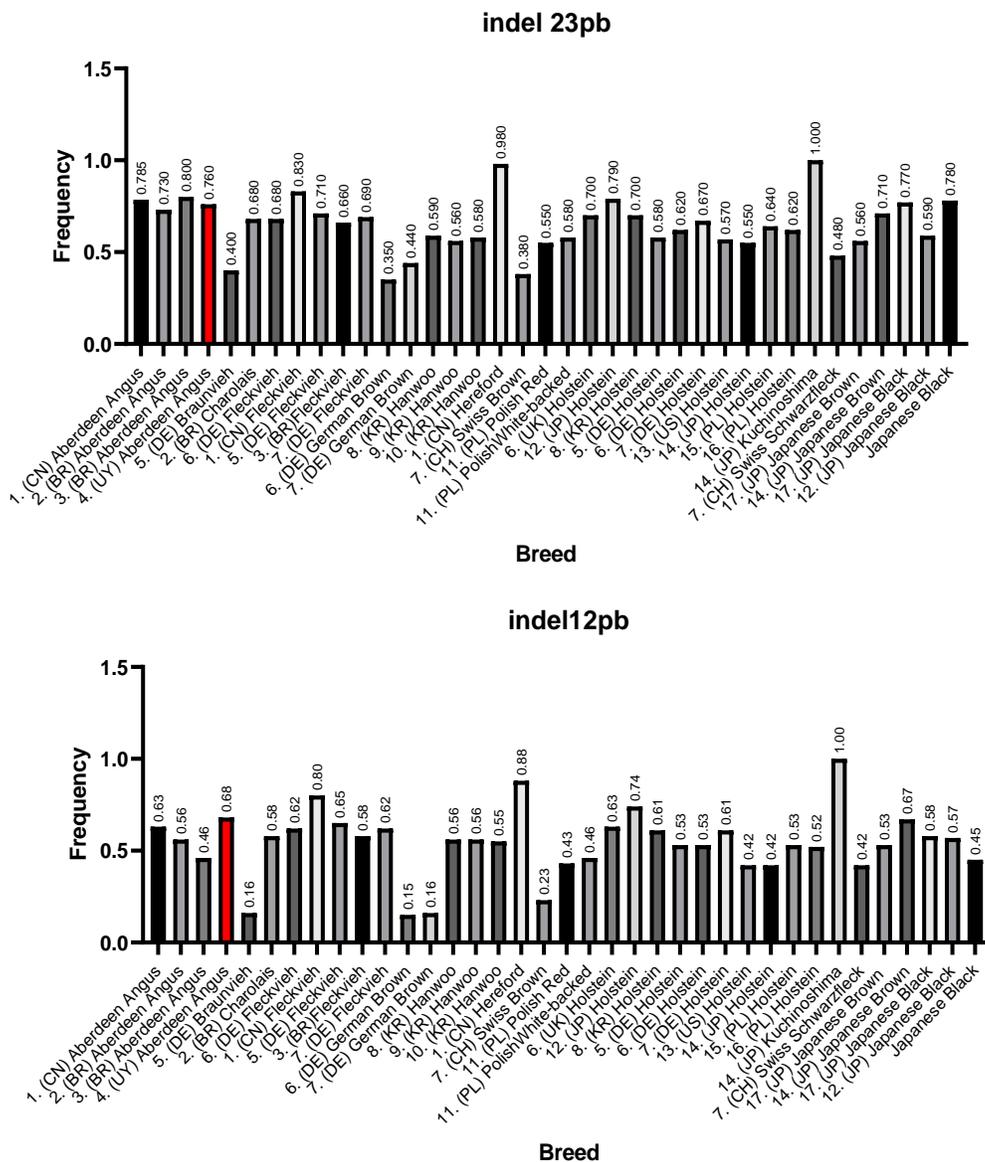


Figura 1. Frecuencia del alelo de delección para los marcadores indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* en diferentes razas bovinas. 1) Zhu et al. (2011), 2) Kerber et al. (2008), 3) Sanches et al. (2016), 4) Present study, 5) Kashkevich et al. (2007), 6) Juling et al. (2006), 7) Hasse et al. (2007), Jeong et al. (2006), 9) Kim et al. (2009), 10) Choi et al. (2012), 11) 12) Nakamitsu et al. (2006), 13) Brunelle et al. (2008), 14) Msalya et al. (2009), 15) Strychalsky et al. (2012), 16) Gurgul et al. (2012), 17) Msalya et al. (2011), 18) Shimogiri et al. (2010). CN: China, BR: Brazil, UY: Uruguay, DE: Germany, KR: Korea, CH: Swiss, PL: Poland, UK: United Kingdom, JP: Japan, US: USA.

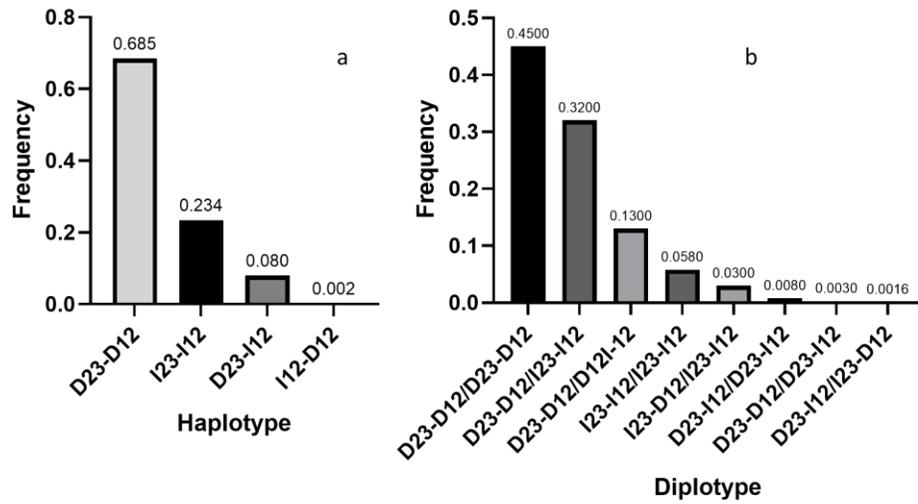


Figure 2. Distribución de los haplotipos (a) y diplotipos (b) para los indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* bovino. La primera letra corresponde al marcador indel23pb y la segunda al indel12pb (D: deletion, I: insertion).

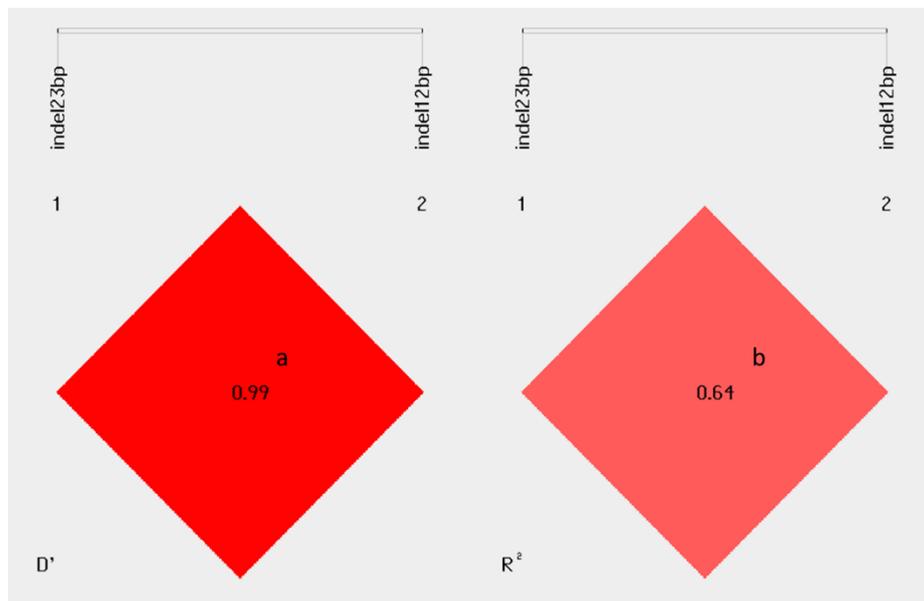


Figure 3. Análisis de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores indel23pb e indel12pb: a) test D' , b) test R^2 ($P < 0.001$)

REFERENCIAS

- [1] Prusiner SB. Prions. PNAS. 1998; 95:13363-13383.
- [2] Cortez LM, Sim VL. Implications of prion polymorphisms. Prion. 2013; 7(4):276-279.
- [3] Aguilar-Calvo P, García C, Espinosa JC, et al. Prion and prion-like diseases in animals. Virus Res. 2015; 207: 82-93.
- [4] Goldmann W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. Vet. Res. 2008; 39:30.
- [5] Curcio L, Sebastiani C, Di Lorenzo P, et al. A review on classical and atypical scrapie in caprine: Prion protein gene polymorphisms and their role in the disease. Animal. 2016; 10(10):1585-1593.
- [6] Robinson SJ, Samuel MD, O'Rourke KI, et al. The role of genetics in chronic wasting disease of North American cervids. Prion. 2012; 6(2):153-62.
- [7] Robinson AL, Williamson H, Güere ME, et al. Variation in the prion protein gene (*PRNP*) sequence of wild deer in Great Britain and mainland Europe. Vet Res. 2019; 50: 59.
- [8] Imran M, Mahmood S. An overview of human prion diseases. Virol J. 2011; 8: 559.
- [9] Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, et al. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (*PRNP*) in German cattle breeds. Neurogenetics. 2004; 5(1): 19-25.
- [10] Hills D, Comincini S, Schlapfer J, et al. Complete genomic sequence of the bovine prion gene (*PRNP*) and polymorphism in its promoter region. Anim. Genet. 2001; 32:231-233
- [11] Sander P, Hamann H, Drögemüller C, et al. Bovine prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms modulate *PRNP* expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. J. Biol. Chem. 2005; 280(45): 37408-37414.
- [12] Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, et al. POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. J. Biol. Chem. 2002; 277: 26761-26768.
- [13] Haase B, Doherr M, Seuberlich T, et al. *PRNP* promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. BMC Genet. 2007; 8:15.

- [14] Kashkevich K, Humeny A, Ziegler U, et al. Functional relevance of DNA polymorphisms within the promoter region of the prion protein gene and their association to BSE infection. *FASEB. J.* 2007; 21(7): 1547-1555.
- [15] Murdoch BM, Clawson M L, Yue S, et al. *PRNP* haplotype associated with classical BSE incidence in European Holstein cattle. *PLoS One*, 2010; 5(9): e12786.
- [16] Gurgul A, Polak MP, Larska M, et al. *PRNP* and *SPRN* genes polymorphism in atypical bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in Polish cattle. *J. Appl. Genet.* 2012; 53(3): 337-342.
- [17] Kerber AR, Hepp D, Passos DT, et al. Polymorphisms of two indels at the *PRNP* gene in three beef cattle herds. *Biochem. Genet.* 2008; 46(1-2): 1-7.
- [18] Sanches CC, Rosinha G, Galvão CE, et al. Polymorphisms in the Prion Protein Gene of cattle breeds from Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 2016; 36(11): 1059-1066.
- [19] Zhu XY, Feng FY, Xue SY, et al. Bovine spongiform encephalopathy associated insertion/deletion polymorphisms of the prion protein gene in the four beef cattle breeds from North China. *Genome.* 2011; 54(10): 805-811.
- [20] Rzewucka-Wójcik E, Frost A, Jędrzejczak M, et al. The *PRNP* ins/del and octapeptide repeat polymorphisms in Jersey cattle and their associations with production traits. *J Appl Anim Res.* 2013; 41(2):244–248.
- [21] Yang Q, Zhang SH, Liu LL, et al. The evaluation of 23-bp and 12-bp insertion /deletion within the *PRNP* gene and their effects on growth traits in healthy Chinese native cattle breeds. *J Applied Animal Res.* 2017;(2):1–7.
- [22] Guan F, Song XM, Li J, et al. Effects of *PRNP* polymorphisms on sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. *J Applied Animal Res*, 2014; 42:3, 284-288,
- [23] Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 4th Ed. New York (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [24] Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, et al. A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol.* 2006; 4:33.

- [25] ALBERTÍ P. Medición del color. In: Cañeque V, Sañudo C, editors. Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes. Madrid: Ministerio de Ciencia y Tecnología – INIA; 2000. pp:159 – 166.
- [26] Folch J, Lee M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497-509.
- [27] Feed O. Metodología para la evaluación de las características cualitativas de la canal y de la carne. In: Bianchi G, Feed O, editors. Introducción a la Ciencia de la Carne. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur; 2010. pp. 181-214.
- [28] Raymond M, Rousset F. Genepop (Version 1.2): Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J. Hered.* 1995; 86: 248-249.
- [29] Galvão CE, Rosinha GMS, Sanches CC, et al. Polymorphisms of intron 1 and the promoter region at the PRNP gene in BSE-free Caracu cattle. *Biochem. Genet.* 2012; 50:657-669.
- [30] Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics.* 1988; 120(3): 849-852.
- [31] Shi YY, Liu HE. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res.* 2005; 15(2):97–98.
- [32] Box G, Cox D. An Analysis of Transformations. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.* 1964; 26(2), 211-252.
- [33] Xue G, Sakudo A, Kim CK, et al. Coordinate regulation of bovine prion protein gene promoter activity by two Sp1 binding site polymorphisms. *Biochem Biophys Res Co.* 2008; 372:530–535.
- [34] Msalya G, Shimogiri T, Nishitani K, et al. Indels within promoter and intron 1 of bovine prion protein gene modulate the gene expression levels in the medulla oblongata of two Japanese cattle breeds. *Anim. Genet.* 2010; 41(2): 218-221.
- [35] Jeong BH, Lee YJ, Kim NH, et al. Genotype distribution of the prion protein gene (*PRNP*) promoter polymorphisms in Korean cattle. *Genome.* 2006; 49(12): 1539-1544.
- [36] Kim Y, Kim JB, Sohn H, et al. A national survey on the allelic, genotypic, and haplotypic distribution of PRNP insertion and deletion polymorphisms in Korean cattle. *J. Genet.* 2009; 88(1): 99-103.

- [37] Choi S, Woo HJ, Lee J. Sequence variations of the bovine prion protein gene (PRNP) in native Korean Hanwoo cattle. *J. Vet. Sci.* 2012; 13(2): 127-137.
- [38] Czarnik U, Zabołewicz T, Strychalski J, et al. Deletion/insertion polymorphism of the prion protein gene (*PRNP*) in Polish Holstein-Friesian cattle. *J. Appl. Genet.* 2007; 48(1): 69-71.
- [39] Brunelle BW, Greenlee JJ, Seabury CM, et al. Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite cattle. *BMC Vet. Res.* 2008; 4(1): 36.
- [40] Msalya G, Shimogiri T, Okamoto S, et al. Gene and haplotype polymorphisms of the Prion gene (*PRNP*) in Japanese Brown, Japanese native and Holstein cattle. *Anim. Sci. J.* 2009; 80(5): 520-527.
- [41] Shimogiri T, Msalya G, Myint SL, et al. Allele distributions and frequencies of the six prion protein gene (*PRNP*) polymorphisms in Asian native cattle, Japanese breeds, and mythun (*Bos frontalis*). *Biochem. Genet.* 2010; 48(9-10): 829-839.
- [42] Isler BJ, Freking BA, Thallman RM, et al. Evaluation of associations between prion haplotypes and growth, carcass, and meat quality traits in a Dorset x Romanov sheep population. *J Anim Sci.* 2006; 84(4):783-8.
- [43] Evoniuk JM, Berg PT, Johnson ML, et al. Associations between genotypes at codon 171 and 136 of the prion protein gene and production traits in market lambs. *Am J Vet Res.* 2007; 68(10):1073-8.
- [44] Vitezica ZG, Beltran de Heredia I, Ugarte E. Short communication: Analysis of association between the prion protein (PRNP) locus and milk traits in Latxa dairy sheep. *J Dairy Sci.* 2013; 96(9):6079-83.
- [45] Lan X, Zhao H, Wu C, et al. Analysis of genetic variability at codon 42 within caprine prion protein gene in relation to production traits in Chinese domestic breeds. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(4):4981-8.
- [46] Sorbolini S, Gaspa G, Steri R, et al. Use of canonical discriminant analysis to study signatures of selection in cattle. *Genet Sel Evol.* 2016; 48(1):58.
- [47] Mancini G, Gargani M, Chillemi G, et al. Signatures of selection in five Italian cattle breeds detected by a 54 K SNP panel. *Mol Biol Rep.* 2014; 41:957-65.

- [48] Kim SW, Hong JM, Seol JW, et al. Cellular prion protein regulates the differentiation and function of adipocytes through autophagy flux. *Mol Cell Endocrinol.* 2019; 481:84-94.
- [49] Arora AS, Zafar S, Latif U, et al. The role of cellular prion protein in lipid metabolism in the liver, *Prion.* 2020; 14:1, 95-108.
- [50] de Brito G, Lupinacci FC, Beraldo FH, et al. Loss of prion protein is associated with the development of insulin resistance and obesity. *Biochem J.* 2017 17; 474(17):2981-2991.
- [51] Dikeman, ME. Genetic effects on the quality of meat from cattle. In: *Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock*; 1990 July 23-27; Edinburgh. p. 521-530.
- [52] Gregory KE; Cundiff LV; Koch RM, et al. Breed effects, retained heterosis, and estimates of genetic and phenotypic parameters for carcass and meat traits of beef cattle. *Journal of Animal Science.* 1994; 72: 1174-1183.

IV. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *PRNP* EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO PARA LOS POLIMORFISMOS INDEL23pb E INDEL12pb EN MÉDULA ESPINAL CERVICAL Y TONSILA PALATINA EN BOVINOS SANOS

Analysis of the *PRNP* gene expression based on genotypes for the indel23pb and indel12pb polymorphisms in cervical spinal cord and palatine tonsils of healthy cattle

Expresión de *PRNP* basada en genotipos para indel23pb e indel12pb.

Rody Artigas^{1*}, Paula Nicolini², Noelia Vazquez³, Silvia Llambí¹, Eileen Armstrong¹.

Unidad Académica de Genética y Mejora Animal. Departamento de Producción Animal y Salud de los Sistemas Productivos. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (Udelar).

*LasPlaces 1550, Montevideo Uruguay. Tel.: +59826285802, rodyartigas@gmail.com.

Fuente de financiación principal: CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica), Udelar.

Este Artículo deriva del trabajo de tesis de Maestría del Dr. Rody Artigas.

¹ Unidad Académica de Genética y Mejora Animal. Departamento de Producción Animal y Salud de los Sistemas Productivos. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República (Udelar). ²Centro Universitario de Tacuarembó. Instituto Superior de la Carne. Área Biología Molecular. Universidad de la República.

³Unidad Académica de Anatomía. Departamento de Biociencias Veterinarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República (Udelar).

RESUMEN

Una vez ingeridos, los priones infecciosos recorren un camino de neuroinvasión centripeta, dónde las tonsilas palatinas y las placas de Peyer son órganos claves de acopio y acumulación temprana. Una vez alcanzada la médula espinal, la PrP^{Sc} se disemina hasta el encéfalo. Los polimorfismos indel23pb e indel12pb dentro del gen *PRNP* han demostrado modular la susceptibilidad a la Encefalopatía Espongiforme Bovina, siendo las deleciones más frecuentes en los animales enfermos, posiblemente por un aumento en los niveles de transcripción del gen. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de expresión de *PRNP* en tonsilas palatinas y médula espinal cervical, y analizar de qué forma el genotipo para los polimorfismos indel23pb e indel12pb afectan esa expresión en ambos tejidos. Se estudió la expresión del gen *PRNP* en 20 animales Aberdeen Angus y Aberdeen Angus x Hereford en tonsila palatina y médula espinal. Los animales fueron agrupados según su genotipo en 5 grupos diferentes. La expresión del gen fue superior en médula espinal cervical que en tonsilas palatinas ($P < 0.0001$). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de acuerdo al genotipo ($P > 0.05$), aunque aumentaba en presencia de los alelos de deleción en la mayoría de los casos. Este trabajo es el primer reporte de la expresión del gen *PRNP* en tonsila palatina y del efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb sobre sus niveles de expresión.

Palabras clave: prion, encefalopatía espongiforme bovina, ARN

ABSTRACT

Once ingested, infectious prions travel a path of centripetal neuroinvasion, where the palatine tonsils and Peyer's patches are key early storage and accumulation tissues. After reaching the spinal cord, PrP^{Sc} spreads to the brain. The indel23pb and indel12pb polymorphisms within the *PRNP* gene have been shown to modulate the susceptibility to Bovine Spongiform Encephalopathy, being the most frequent deletions in diseased animals, possibly due to an increase in the transcription levels of the gene. The objective of this work was to evaluate *PRNP* expression levels in palatine tonsils and cervical spinal cord, and to analyze how the genotype for indel23pb and indel12pb polymorphisms affect this expression in both tissues. The expression of the *PRNP* gene was studied in 20 Aberdeen Angus and Aberdeen Angus x Hereford animals in palatine tonsil and spinal cord. The animals were grouped according to their genotype in 5 different groups. The expression of the gene was higher in the cervical spinal cord than in the palatine

tonsils ($P < 0.0001$). No significant differences were observed in expression levels according to genotype ($P > 0.05$), although it increased in the presence of deletion alleles in most cases. This work is the first report on the expression of the *PRNP* gene in palatine tonsil and the effect of indel23pb and indel12pb polymorphisms on its expression levels.

Keywords: prion, bovine spongiform encephalopathy, RNA.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades provocadas por priones, entre ellas la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), son un grupo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por la acumulación a nivel del sistema nervioso central de una isoforma patológica (PrP^{sc}) de la proteína prión celular (PrP^{c}). Ambas proteínas están codificadas por el gen *PRNP* y presentan la misma secuencia de aminoácidos, pero con diferencias en su estructura tridimensional (Biasini et al., 2012). Los mecanismos moleculares que llevan a la transformación de PrP^{c} en PrP^{sc} aún no se conocen, sin embargo, la importancia de la PrP^{c} en la propagación y transmisión de las enfermedades priónicas ha sido bien establecida (Bueller et al., 1993; Brandner et al., 1996; Fischer et al., 1996; Mallucci et al., 2003)

Polimorfismos en el gen *PRNP* han demostrado modular la susceptibilidad a las enfermedades priónicas en ovinos (Goldmann, 2008), caprinos (Curcio et al., 2016), ciervos (Robinson et al., 2012; Robinson et al., 2019), ratones (Cortez & Sims, 2013; Aguilar-Calvo et al., 2014), y humanos (Imran & Mahmood, 2011). Particularmente en los bovinos, se sabe que un indel de 23pb en la región promotora del gen (Sander et al., 2004) y un indel de 12pb en el intrón 1 (Hills et al., 2001), han demostrado afectar la susceptibilidad a la enfermedad a la cEEB.

Análisis bioinformáticos han demostrado que los alelos de inserción actúan como sitio de unión para el represor RP58 (inserción 23pb) y la proteína SP1 (inserción 12pb) (Sander et al., 2005). Así, en presencia de ambos alelos de inserción (haplotipo I23-I12), RP58 se uniría al promotor reprimiendo la expresión de *PRNP* por medio de la interacción con SP1 (Lee et al., 2002). Opuestamente, el haplotipo D23-D12 induciría fallas en la regulación de *PRNP*, aumentando sus niveles de expresión y, posiblemente, la susceptibilidad a la enfermedad (Sander et al., 2005). Al comparar animales sanos con animales afectados por cEEB, se observó con más frecuencia el haplotipo D23-D12 en los animales enfermos que en

los sanos (Juling et al., 2006; Hasse et al., 2007; Kashkevich et al., 2007; Murdoch et al., 2010; Gurgul et al., 2012).

La forma en que PrP^{Sc} llega al cerebro aún no está de todo dilucidada, pero una vez ingerida sigue un patrón de diseminación centrípeta, en el que pasa del sistema digestivo al sistema nervioso central (Gough y Madisson, 2003). Las Placas de Peyer (Terry et al., 2003; Espinosa et al., 2007; Hoffman et al., 2007) y las tonsilas palatinas (Wells et al., 2005; Espinosa et al., 2007) serían los primeros órganos de acopio y amplificación de PrP^{Sc}. A través de los plexos nerviosos localizados en la mucosa intestinal y los nervios mesentéricos, la PrP^{Sc} se acumularía en el complejo ganglionar celíaco mesentérico, para luego ascender a la porción torácica de la médula espinal a través de los nervios espláncnicos (con posterior diseminación rostral hacia el encéfalo) y al tallo cerebral vía nervio vago y ganglio nodoso (Balkema-Buschmann et al., 2011; Kaatz et al., 2012; Corona et al. 2017).

Los niveles de expresión del gen *PRNP* aún no han sido determinados en todos los órganos de la ruta hacia la neuroinvasión, y se desconoce cómo los polimorfismos indel23pb e indel 12pb podrían afectar esa expresión. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los polimorfismos indel23pb e indel 12pb sobre los niveles de expresión del gen *PRNP* en dos órganos de importancia para la enfermedad: la tonsila palatina como uno de los órganos tempranos de acopio y amplificación de PrP^{Sc}, y la médula espinal cervical como un órgano más tardío en el camino a la neuroinvasión.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras, extracción de ARN y transcripción reversa.

Se seleccionaron 20 muestras de médula espinal cervical y de tonsila palatina de bovinos sanos pertenecientes al banco de muestras de la unidad académica de Genética y Mejora Animal, Facultad de Veterinaria, Udelar. Cada par de muestras estaba conservado en freezer a -80 °C y pertenecía a un mismo animal, del cual se conocía su genotipo para los marcadores indel23pb e indel12pb del gen *PRNP* bovino. Los animales pertenecían a la raza Aberdeen Angus (16 novillos) o cruza Aberdeen Angus x Hereford (3 novillos y 1 vaquillona), y provenían de diferentes establecimientos productivos de Uruguay. Para cada tejido, los animales fueron agrupados de acuerdo a su genotipo para los polimorfismos indel23pb e indel12pb: I23-I23/D12-D12 (n=4); I23-D23/D12-D12 (n=5); D23-D23/D12-D12 (n=4); D23-D23/I12-

D12 (n=4); I23-D23/I12-D12 (n=3). Un número similar de animales por diplotipo fue empleado anteriormente en otros trabajos (Sander et al., 2005; Msalya et al., 2011).

El ARN total fue extraído a partir de 100mg de tejido utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Una vez aislado, el ARN fue tratado con cloruro de litio para remover inhibidores de la síntesis de cDNA; la contaminación con DNA se eliminó utilizando el kit DNFree™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Naderi et al., 2004). La concentración de ARN fue determinada mediante la medición de la absorbancia a 260nm (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA); la pureza mediante las relaciones de absorbancia 260nm/280nm (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA), y la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Todas las muestras presentaron una relación de absorbancia 260/280 de 1.98 ± 0.03 . Para cada muestra, el cDNA fue sintetizado por transcripción reversa mediante el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System, de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando 1 µg de ARN total.

PCR cuantitativa en tiempo real

La secuencia de los primers y el tamaño esperado de los productos de amplificación para el gen *PRNP* y para los controles endógenos beta-actina (*ACTB*), hypoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*HPRT*) y proteína ribosómica 9 (*RPS9*) se muestran en la tabla 1. La PCR en tiempo real fue realizada en un volumen de reacción de 15 µl, conteniendo: 7.5 µl de master mix Quantinova SYBR®Green (Qiagen, Alemania), concentraciones equimolares de primers forward y reverse (200nM), 2 µl de una dilución 1:10 de cDNA, y agua libre de RNasa/DNasa hasta alcanzar el volumen final.

Las muestras fueron analizadas en duplicado utilizando un disco de 72 pocillos en termociclador Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, NSW, Australia). Las condiciones de amplificación para todos los genes fueron las siguientes: 2 min at 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 40 s a 60 °C, y 10 s a 72 °C. Al final del programa de ciclado, se analizaron las curvas de disociación para identificar el producto amplificado y descartar cualquier contaminación con ADN o la formación de dímeros de primers. Se utilizó como control exógeno un pool de todas las muestras de cDNA al que se le realizaron 5 diluciones (100ng, 50ng, 25ng, 12.5ng y 6.25ng/tubo) que fueron utilizadas para la regresión lineal de cada gen. La eficiencia del ensayo fue calculada utilizando la fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$ (tabla 1) (Rutledge and Cote, 2003). La expresión génica fue medida mediante una cuantificación relativa respecto al control exógeno y

normalizada en función de la media geométrica de la expresión de los genes empleados como controles endógenos (*HPRT* y *RPS9*), teniendo en cuenta sus respectivas eficiencias (Vandesompele et al., 2002). El coeficiente de variación intra e interensayo fue 0.81% y 0.33% respectivamente. La expresión de los controles endógenos se mantuvo invariable entre las muestras y tejidos de este estudio. El gen housekeeping *ACTB* fue probado y se descartó por presentar una baja performance en las muestras analizadas.

Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento GLM del software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) para evaluar la expresión de *PRNP*, considerando en el modelo los efectos fijos del diplotipo (D), el tejido (T), y sus interacciones. Se ha demostrado que el sexo no afecta los niveles de expresión de *PRNP* en médula oblonga (Msalya et al., 2011), por lo que no fue considerado en el modelo. La raza no fue considerada como un efecto fijo, por tratarse de animales cruza con Aberdeen Angus. Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados \pm el error estándar. *P*-valores <0.05 se consideraron como significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión del gen *PRNP* en las tonsilas palatinas y en la médula espinal cervical se muestra en la figura 1. La misma fue muy dispar, siendo significativamente mayor en la médula espinal cervical que en las tonsilas palatinas ($P<0.0001$). Si bien la expresión relativa en otros tejidos no fue determinada en este trabajo, se ha comunicado que la expresión de *PRNP* es elevada en órganos linfoides de bovinos, así como en diferentes órganos del sistema nervioso central, en relación a otros como pulmón y riñón (Tichopad et al., 2002). Para nuestro conocimiento, este trabajo es el primer reporte de los niveles de expresión de mRNA de *PRNP* en tonsilas palatinas.

Tichopad et al. (2002) comunican que, en bovinos, la expresión de *PRNP* en linfonodos bronquiales no es diferente a la de otros tejidos linfoides como el timo y el bazo, e incluso es mayor a la de ciertos órganos del sistema nervioso como la médula espinal en sus segmentos cervical, torácico y lumbar. Si bien es cierto que no todo el mRNA se traduce a proteínas, Peralta y Eystone (2009) encontraron datos disímiles al cuantificar la proteína final (PrP^C) por Western blot. La mayor cantidad relativa de PrP^C se observó en tejidos del sistema nervioso central, entre ellos la medula espinal, seguido del timo, siendo los linfonodos (en este caso mesentéricos) uno de los órganos con menor cantidad de PrP^C, junto con el pulmón, músculo

esquelético, riñón, piel, páncreas e hígado (Peralta y Eyestone, 2009). Sander et al. (2005) también encuentran una mayor expresión de RNAm de *PRNP* en el tronco encefálico seguido del bazo, hígado y por último de los linfonodos mesentéricos.

No hay reportes anteriores a este trabajo acerca de la expresión del gen *PRNP* en las tonsilas palatinas, a pesar de haberse relacionado con la patogenia de la cEEB. Normalmente, en los animales afectados por enfermedades priónicas, la proteína infecciosa se encuentra en aquellos tejidos en los que la cantidad de PrP^C es alta, y no en aquellos en los que es más baja (Colinge, 2001). En este sentido, las tonsilas palatinas y las placas de Peyer constituyen posibles puertas de entrada para el agente infeccioso en las diferentes enfermedades priónicas como en el Scrapie (Acín et al., 2021). En el caso de la cEEB, esos son los primeros órganos de acopio y amplificación de PrP^{Sc} (Wells et al., 2005; Espinosa et al., 2007), detectándose la presencia de PrP^{Sc} en las tonsilas dentro de los 6 – 10 meses post infección (Wells et al., 2005).

La forma en que los polimorfismos indel23pb e indel12pb afectan los niveles de ARNm del gen *PRNP* bovino aún no es del todo clara, y son pocos los trabajos que lo evalúan. Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte de ese efecto en tonsila palatina y en médula espinal cervical. Para determinar la influencia del marcador indel23pb se compararon tres grupos de animales con los siguientes diplotipos: I23-I23/D12-D12, I23-D23/D12-D12 y D23-D23/D12-D12. En los tres grupos se mantuvo constante el haplotipo para el marcador indel12pb (D12-D12), a los efectos de evaluar el efecto del otro marcador. Es de esperar que un mismo genotipo en el locus de 12pb tenga un mismo efecto sobre el diplotipo (Msalya et al., 2011).

En la tabla 2 se muestran los niveles de expresión de *PRNP* en tonsila palatina y médula espinal. A diferencia de la tonsila palatina, en la médula espinal cervical es claro que el orden de expresión es D23-D23>I23-D23>I23-I23, sin embargo, en ninguno de los dos tejidos se observaron diferencias significativas de acuerdo al genotipo ($P > 0.05$). Resultados similares fueron comunicados por Msalya et al. (2011) al estudiar el efecto del marcador indel23pb en muestras de médula oblonga de bovinos de la raza Japanese Brown. Sander et al. (2005) tampoco encuentran efecto de ese polimorfismo en el tronco encefálico, en el bazo, ni en el hígado. Sin embargo, se ha visto que el alelo D23 aumenta la expresión del gen *PRNP* en

médula oblonga de bovinos Japanese Black (Msalya et al., 2011) y en linfonodos mesentéricos (Sander et al., 2005).

Para evaluar la influencia del polimorfismo indel12pb sobre la expresión de *PRNP* se compararon animales de dos diplotipos diferentes: D23-D23/I12-D12 y D23-D23/D12-D12. Como se muestra en la tabla 2, en ninguno de los dos tejidos se observaron diferencias significativas de acuerdo al genotipo ($P > 0.05$), aunque se observó una menor expresión cuando el alelo I12 estaba presente en el diplotipo. Resultados similares fueron comunicados por Sander et al. (2005) en tronco encefálico, bazo e hígado, sin embargo, encuentran un fuerte efecto del genotipo heterocigota I12-D12 que aumenta la expresión de *PRNP* en linfonodo mesentérico, respecto al genotipo D12-D12 e I12-I12. En una línea similar, se observó que, en médula oblonga de bovinos Japanese Black y Japanese Brown, la expresión del gen era superior para el genotipo heterocigota I12-D12 respecto a los homocigotas, evidenciando un posible fenómeno de sobredominancia o dominancia polar (Msalya et al., 2011).

Para comparar el efecto de los alelos de inserción en ambos polimorfismos sobre la expresión de *PRNP*, se evaluaron los diplotipos I23-D23/I12-D12 y D23-D23/D12-D12. Como se ve en la tabla 2, para ambos tejidos, no se observaron diferencias significativas en la expresión de acuerdo al genotipo ($P > 0.05$), sin embargo, en los diplotipos donde estaban presentes los alelos de inserción la expresión fue menor. Resultados similares fueron encontrados por otros autores en tronco encefálico, bazo, hígado y linfonodo mesentérico (Sander et al., 2005).

Los genotipos de delección para los polimorfismos indel23pb e indel12pb se han visto sobrerrepresentados en los animales enfermos de cEEB (Sander et al., 2004; 2005; Juling et al., 2006; Hasse et al., 2007; Gurgul et al., 2012), posiblemente debido a la pérdida de los sitios de unión para el represor RP58 y para la proteína SP1 (Sander et al., 2004; Sander et al., 2005). La posibilidad de que mutaciones en regiones reguladores de *PRNP* aumenten la expresión del gen y que esto influya en el periodo de incubación o la susceptibilidad a la cEEB fue primeramente establecida por Sander et al. (2005). Sin embargo, la expresión del gen *PRNP* bovino es muy disímil entre los diferentes tejidos (Tichopad et al., 2002; Sander et al., 2005) y el efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb no es el mismo en todos ellos. Otros elementos de regulación podrían encontrarse en juego y contribuir a explicar las diferencias reportadas en relación a los efectos del genotipo entre los diferentes tejidos. En este sentido, se han demostrado nuevos

elementos de regulación epigenética para *PRNP* en diferentes tejidos de ratón (Dalai et al., 2017a) y en líneas celulares murinas (Dalai et al., 2017b).

En resumen, la expresión del gen *PRNP* fue mayor en la médula espinal cervical que en la tonsila palatina de bovinos adultos sanos. No encontramos efecto significativo del genotipo sobre los niveles de expresión del gen en esos tejidos, si bien la presencia de los alelos de delección tendía a aumentar la expresión de *PRNP* en la mayoría de los casos. Si bien el número de animales utilizados fue similar al de otros trabajos, nuevos estudios con un mayor número de animales por grupo deben realizarse para confirmar estos resultados. Este trabajo aporta nueva información acerca de la expresión del gen *PRNP* en órganos de importancia en la ruta de los priones hacia la neuroinvasión, que podría contribuir a comprender de mejor manera la patogenia molecular de las enfermedades priónicas.

Tabla 1. Primers usados para la cuantificación del cDNA del gen *PRNP* y de los genes controles endógenos

Gen*	Número de acceso	Primer	Tamaño (pb)	Eficiencia	Referencia
<i>PRNP</i>	AJ298878	F: TCCAACCTTGAGCTGAATCACA R: CAGGTTTTGGTCGCTTCTTG	153	0.93	Msalya et al. (2011)
<i>HPRT</i>	XM_580802	F: TGGAGAAGGTGTTTATTCCTC ATG R: CACAGAGGGCCACAATGTGA	105	0.93	Carriquiry et al. (2009)
<i>RPS9</i>	NM_110115 2	F: CCTCGACCAAGAGCTGAAG R: CCTCCAGACCTCACGTTTGTT C	63	0.94	Astessiano et al. (2017)
<i>ACTB</i>	BT030480	F: CGTGGCTACAGCTTCACC R: GAAATCGTCCGTGACATCAA	53	--	Astessiano et al. (2017)

PRNP: Poteína Prion; *HPRT*: hypoxantin fosforribosil transferasa (control endógeno); *RPS9*: Proteína ribosómica S9 (control endógeno). * Secuencias bovinas obtenidas de GenBank.

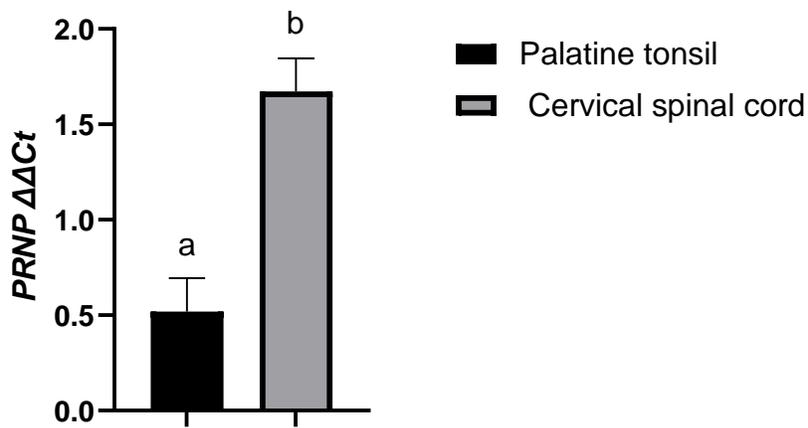


Figura 1. Expresión del gen *PRNP* en tonsila palatina y medula espinal cervical. Los valores son las medias de mínimos cuadrados (media \pm S.E.M), a vs b $P < 0.05$.

Tabla 2. Expresión del gen *PRNP* según varios diplotipos para los indel23pb e indel12pb en tonsila palatina y médula espinal cervical.

Diplotipo	n	Tonsila Palatina		Médula espinal cervical	
		Mean <i>PRNP</i>	S.E.M	Mean <i>PRNP</i>	S.E.M
I23-I23/D12-D12	4	1.0940	0.3842	1.2058	0.3842
I23-D23/D12-D12	5	0.5202	0.3436	1.4024	0.3436
D23-D23/D12-D12	4	0.4884	0.3842	2.1913	0.3842
D23-D23/I12-D12	4	0.2686	0.4436	2.0968	0.4436
I23-D23/I12-D12	3	0.2283	0.3842	1.4664	0.3842

No se observó efecto del diplotipo ($P > 0.05$) sobre la expresión de *PRNP* en ninguno de los dos tejidos.

CONCLUSIONES

- La expresión del gen *PRNP* tuvo un fuerte efecto tejido dependiente, en las muestras y animales estudiados, siendo claramente mayor en la médula espinal cervical.
- El genotipo para los indel23pb e indel12pb no afectó la expresión del gen *PRNP* en los tejidos analizados, aunque un mayor número de animales por genotipo deben estudiarse para confirmar estos resultados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la CSIC, Udelar y PEDECIBA, Udelar por la financiación de este trabajo. A la Dra. Florencia Iglesias por la gestión del muestreo.

LITERATURA CITADA

1. Acín C, Bolea R, Monzón M, Monleón E, Moreno B, Filali H, Marín B, Sola D, Betancor M, Guijarro IM, García M, Vargas A, Badiola JJ. Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. Review on the Etiology, Genetic Factors, Pathogenesis, Diagnosis, and Control Measures of Both Diseases. *Animals (Basel)*. 2021. 4;11(3):691. doi: 10.3390/ani11030691.
2. Aguilar-Calvo P, García C, Espinosa JC, Andreoletti O, Torres JM. Prion and prion-like diseases in animals. *Virus Res*. 2015. 207: 82-93.
3. Astessiano AL, Meikle A, Chilibruste P, Mattiauda DA, Fajardo M, Carriquiry M. Metabolic Adaptations Due to the Inclusion of Pasture in the Diet of Dairy Cows Fed Total Mixed Ration during Early Lactation. *Open Journal of Animal Sciences*. 2017.7: 127-140
4. Balkema-Buschmann A, Fast C, Kaatz M, Eiden M, Ziegler U, McIntyre L, Keller M, Hills B, Groschup MH. Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Prev. Vet. Med.* 2011. 102(2), 112-117.
5. Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci*. 2012. 35(2): 92-103.
6. Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*. 1996. 379(6563): 339.-343

7. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. 1993. *Cell*. 73: 1339–1347.
8. Carriquiry M, Weber WJ, Fahrenkrug SC, Crooker BA. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J. Dair. Sci.* 2009. 92: 4889–4900
9. Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci.* 2001. 24:519-50. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.519.
10. Corona C, Vallino E, Lulini B, Caramelli M, Bozzetta E, Mazza M, Desiato R, Ru G, Casalone C. (2017). Phenotypical Variability in Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiology, Pathogenesis, and Diagnosis of Classical and Atypical Forms. En G. Legname y S. Vani. *Prion Protein (242-265)*. San Diego, Estados Unidos. Ed. Elsevier
11. Cortez LM, Sim VL. Implications of prion polymorphisms. *Prion.* 2013. (4):276-9. doi: 10.4161/pri.25566.
12. Curcio L, Sebastiani C, Di Lorenzo P, Lasagna E, Biagetti M. Review: A review on classical and atypical scrapie in caprine: Prion protein gene polymorphisms and their role in the disease. *Animal.* 2016. 10(10):1585-93. doi: 10.1017/S1751731116000653.
13. ^aDalai W, Matsuo E, Takeyama N, Kawano J, Saeki K. 2016. CpG site DNA methylation patterns reveal a novel regulatory element in the mouse prion protein gene. *J. Vet. Med. Sci.* 2017. 79(1), 100–107. doi:10.1292/jvms.16-0390
14. ^bDalai W, Matsuo E, Takeyama, N, Kawano J, Saeki K. 2017. Increased expression of prion protein gene is accompanied by demethylation of CpG sites in a mouse embryonal carcinoma cell line, P19C6. *J. Vet. Med. Sci.* 2017. 79(3), 644–648. doi:10.1292/jvms.16-0554
15. Espinosa JC, Morales M, Castilla J, Rogers M, Torres JM. Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *J. Gen. Virol.* 2007. 88, 1379–1383.
16. Fischer M, Rulicke A, Raeber A, Sailer A. Prion protein (PrP) with amino proximal deletions restoring susceptibility of PrP Knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 1996. 15 1255-1264.
17. Goldmann W. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet. Res.* 2008. 39:30.

18. Gough KC, Maddison BC. Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*. 2010. 4(4), 275–282. doi:10.4161/pri.4.4.13678
19. Gurgul A, Polak MP, Larska M, Słota E. PRNP and SPRN genes polymorphism in atypical bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in Polish cattle. *J. Appl. Genet.* 2012. 53(3): 337-342.
20. Haase B, Doherr M, Seuberlich T, Drögemüller C, Dolf G, Nicken P, Schiebe K, Ziegler U, Groschup M, Zurbriggen A, Leeb T. PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet.* 2007. 8:15.
21. Hills D, Comincini S, Schlapfer J, Dolf G, Ferretti L, Williams JL. Complete genomic sequence of the bovine prion gene (PRNP) and polymorphism in its promoter region. *Anim. Genet.* 2001. 32:231_233
22. Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, Weber A, Kupfer L, Oelschlegel A, Hammerschmidt B, Groschup MH, Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* 2007. 88, 1048–1055
23. Imran M, Mahmood S. An overview of human prion diseases. *Virol J.* 2011 Dec 24; 8:559. doi: 10.1186/1743-422X-8-559.
24. Juling K, Schwarzenbacher H, Williams JL, Fries R. A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol.* 2006. 4(1): 33.
25. Kaatz M, Fast C, Ziegler U, Balkema-Buschmann A, Hammerschmidt B, Keller M, Oelshlegel A, McIntyre L, Groschup MH. Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012. 181(2), 515-524.
26. Kashkevich K, Humeny A, Ziegler U, Groschup MH, Nicken P, Leeb T, Fischer C, Becker C, Schiebel, K. Functional relevance of DNA polymorphisms within the promoter region of the prion protein gene and their association to BSE infection. *FASEB. J.* 2007. 21(7): 1547-1555.
27. Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, Hur MW. POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 26761-26768.
28. Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klöhn PC, Brandner S, Collinge J. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science.* 2003. 302(5646), 871-874.

29. Murdoch BM, Clawson ML, Yue S, Basu U, McKay S, Settles M, Capoferri R, Laegreid WW, Williams JL, Moore SS. PRNP haplotype associated with classical BSE incidence in European Holstein cattle. *PLoS One*. 2010. 5(9): e12786.
30. Msalya G, Shimogiri T, Nishitani K, Okamoto S, Kawabe K, Minesawa M, Maeda Y. Indels within promoter and intron 1 of bovine prion protein gene modulate the gene expression levels in the medulla oblongata of two Japanese cattle breeds. *Anim. Genet*. 2010. 41(2): 218-221
31. Peralta OA, Eyestone WH. Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP(C)) expression in bovine somatic tissues. *Prion*. 2009. 3(3), 161–170.
32. Robinson SJ, Samuel MD, O'Rourke KI, Johnson CJ. The role of genetics in chronic wasting disease of North American cervids. *Prion*. 2012 Apr-Jun;6(2):153-62. doi: 10.4161/pri.19640. Epub 2012 Apr 1. PMID: 22460693
33. Robinson AL, Williamson H, Güere ME, Tharaldsen H, Baker K, Smith SL, Pérez-Espona S, Krojerová-Prokešová J, Pemberton JM, Goldmann W, Houston F. Variation in the prion protein gene (*PRNP*) sequence of wild deer in Great Britain and mainland Europe. *Vet Res* 2019. 50, 59 <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0675-6>
34. Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*. 2003. 31, e93
35. Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, Leeb T. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics*. 2004. 5(1): 19-25.
36. Sander P, Hamann H, Drögemüller C, Kashkevich K, Schiebel K, Leeb T. Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem*. 2005. 280(45): 37408-37414.
37. Terry LA, Marsh S, Ryder SJ, Hawkins SA, Wells GA, Spencer YI. Detection of disease specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec*. 3003.152, 387–392
38. Tichopad A, Pfaffl MW, Didier A. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. *Molecular and cellular probes*. 2003. 17(1), 5-10.

39. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
40. Wells GAH, Spiropoulos J, Hawkins SAC, Ryder SJ. Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Vet. Rec.* 2005. 156, 401–407

COMENTARIOS GENERALES

La cEEB pasará a la historia de las ciencias veterinarias, como una de las enfermedades que más pérdidas económicas ha producido, con una alta percepción de riesgo por parte de los consumidores. Las barreras impuestas a la comercialización de productos, o a la utilización de ciertos subproductos bovinos en la industria farmacéutica y cosmética constituyen barreras que perduran hasta hoy, a pesar de que los casos han bajado a cifras de un solo dígito (Cassalone y Hope, 2018). Dado el declive de los casos de cEEB y el aumento de las presiones de la industria, las autoridades de la UE han comenzado a considerar la posibilidad de reincorporar las HCH a la alimentación animal (Hour et al., 2019). En este escenario, conocer la distribución poblacional y los efectos biológicos de los polimorfismos indel23pb e indel12pb recobra importancia.

En este trabajo de tesis logramos demostrar que el gen *PRNP* era polimórfico en los diferentes grupos raciales empelados, con perfiles productivos muy diferenciados (bovinos altamente seleccionados para carne o leche y bovinos no sujetos a selección artificial). En los animales altamente seleccionados (Aberdeen Angus, Aberdeen Angus x Hereford y Holstein Friesian) las frecuencias de los alelos de delección, asociadas a mayor susceptibilidad a la cEEB fue mayoritaria, pero no muy diferente de la ya comunicada en la literatura para las razas estudiadas. Sin embargo, en los bovinos Criollos Uruguayos, donde la selección artificial es prácticamente inexistente, los alelos de inserción fueron más abundantes. Observaciones similares ya fueron realizadas por otros autores, quienes reportan que las razas más primitivas, con menos selección, presentan una mayor frecuencia de los alelos de inserción (Gurgul et al., 2012).

La selección a favor de caracteres sanitarios puede acarrear efectos no deseados sobre décadas de selección productiva en las diferentes razas bovinas. El efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb sobre caracteres productivos ha sido muy poco estudiado. Para nuestro conocimiento, esta tesis de maestría es la primera comunicación de ese efecto sobre características de la carne y la canal. Se observaron asociaciones de los alelos y genotipos de delección con un mayor largo de la canal y mayor porcentaje de grasa intramuscular. Esto puede contribuir a explicar por qué la frecuencia de los alelos de delección es tan elevada en la raza Aberdeen Angus, altamente seleccionada, a diferencia de lo que ocurre con Criollo Uruguayo.

El efecto de los polimorfismos indel23pb e indel12pb sobre la susceptibilidad a la cEEB ha sido atribuido a que los alelos de delección inducirían a fallas en la regulación del gen *PRNP*, aumentando su expresión y en consecuencia la cantidad de PrP^C en los tejidos. Aumentos de expresión para los genotipos de delección fueron reportados para nódulo linfático mesentérico y médula oblonga (Sander et al., 2005;

Msalya et al; 2011), aunque no se observó en muchos otros tejidos analizados (Sander et al; 2005). En este trabajo de tesis, determinamos la expresión de *PRNP* en dos órganos importantes para la patogenia de la cEEB: las tonsilas palatinas y la médula espinal. Para nuestro conocimiento, determinamos por primera vez los niveles de expresión de *PRNP* en las tonsilas palatinas, siendo claramente menor al de la médula espinal cervical. Si bien no se observó efecto significativo del genotipo sobre la expresión de *PRNP*, en la mayor parte de las muestras analizadas la tendencia era a aumentar cuando los alelos de delección estaban presentes. Sin embargo, un mayor número de animales debe analizarse para tonsila palatina y médula espinal cervical, a los efectos de comprobar nuestros resultados.

LITERATURA CITADA

1. Acín, C.; Bolea, R.; Monzón, M.; Monleón, E.; Moreno, B.; Filali, H.; Marín, B.; Sola, D.; Betancor, M.; Guijarro, I.M.; García, M.; Vargas, A.; Badiola, J.J. (2021) Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. Review on the Etiology, Genetic Factors, Pathogenesis, Diagnosis, and Control Measures of Both Diseases. *Animals*. 11, 691. <https://doi.org/10.3390/ani11030691>
2. Aguilar-Calvo, P., García, C., Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Torres, J. M. (2015). Prion and prion-like diseases in animals. *Virus Res*. 207: 82-93.
3. Aguzzi, A., Calella, A. M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol. Rev.* 89(4): 1105-1152.
4. Aguzzi, A., Sigurdson, C., Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* 3: 11-40.
5. Anderson, R. A., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E. J., Watt, C.J., Udy, H.J., MaWhinney, S., Dunston, S.P., Southwood, T.R.E, Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M, Huinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R., Wells, G.A.H. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*. 382(6594): 779-788.
6. Arnold ME, Ryan JB, Konold T, et al. Estimating the temporal relationship between PrPSc detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy of cattle. *J Gen Virol*. 2007; 88: 3198–3208.
7. Artigas, R. (2017). Análisis de los polimorfismos del gen PRNP relacionados a la encefalopatía espongiforme bovina en la raza Aberdeen Angus de Uruguay. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. 87pp.
8. Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Kaatz, M., Eiden, M., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hills B., Groschup, M. H. (2011). Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Preventive veterinary medicine*, 102(2), 112-117.
9. Baron, T.; Vulin, J.; Biacabe, A.-G.; Lakhdar, L.; Verchere, J.; Torres, J.-M.; Bencsik, A. (2011) Emergence of classical bse strain properties during serial passages of h-bse in wild-type mice. *PLoS ONE* 6, e15839.
10. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D. F., McKinley M.P., Prusiner S.B., Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. 46(3): 417-428.
11. Beringue, V., Andréoletti, O., Le Dur, A., Essalmani, R., Vilotte, J. L., Lacroux, C., Reine, F., Herzog, L., Biacabe, A., Baron T., Caramelli, M., Casalone, C., Laude, H. (2007). A bovine prion acquires an

epidemic bovine spongiform encephalopathy strain-like phenotype on interspecies transmission. *J. Neurosci.* 27(26): 6965-6971.

12. Biasini, E., Turnbaugh, J. A., Unterberger, U., Harris, D. A. (2012). Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci.* 35(2): 92-103.
13. Biacabe, A. G., Morignat, E., Vulin, J., Calavas, D., Baron, T. G. (2008). Atypical bovine spongiform encephalopathies, France, 2001–2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14(2): 298-300.
14. Boujon, C. L., Serra, F., Seuberlich, T. (2016). Atypical variants of bovine spongiform encephalopathy: rare diseases with consequences for BSE surveillance and control. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 158(3): 171-177.
15. Bradley, R., Collee, J. G., Liberski, P. P. (2006). Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 1. *Folia Neuropathol.* 44(2): 93-101.
16. Bravard, A., Auvré, F., Fantini, D., Bernardino-Sgherri, J., Sissoëff, L., Daynac, M., Xu Z., Etienne O., Dehen C., Comoy E., Boussin, F. D, Tell G., Deslys J.P., Radicella J.P. (2015). The prion protein is critical for DNA repair and cell survival after genotoxic stress. *Nucleic Acids. Res.* 43(2): 904-916.
17. Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Aguzzi, A. (2010). Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.* 13(3): 310-318.
18. Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature.* 389 (6650): 498-501.
19. Budka, H., Will, R. G. (2015). The end of the BSE saga: do we still need surveillance for human prion diseases. *Swiss Med Wkly.* 145: w14212.
20. Capobianco, R., Casalone, C., Suardi, S., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Bruzzone, M. G. (2007). Conversion of the BASE prion strain into the BSE strain: the origin of BSE? *PLoS Pathog.* 3(3): e31
21. Casalone C, Hope J. Atypical and classic bovine spongiform encephalopathy. (2018) *Handb Clin Neurol.* 153: 121-134. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00007-6. PMID: 29887132.
22. Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(9): 3065-3070.
23. Castle, A. R., Gill, A. C. (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front. Mol. Biosci.* 4:19.

24. Chong A, Kennedy I, Goldmann W, Green A, González L, Jeffrey M, Hunter N. (2015) Archival search for historical atypical scrapie in sheep reveals evidence for mixed infections. *J Gen Virol.* 96(10):3165-3178. doi: 10.1099/jgv.0.000234. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26281831; PMCID: PMC5410109.
25. Choi, S. H., Kim, I. C., Kim, D. S., Kim, D. W., Chae, S. H., Choi, H. H. y Park, H. S. (2006). Comparative genomic organization of the human and bovine PRNP locus. *Genomics.* 87(5): 598-607.
26. Cohen, O. S., Kimiagar, I., Korczyn, A. D., Nitsan, Z., Appel, S., Hoffmann, C., Chapman, J. (2016). Unusual presentations in patients with E200K familial Creutzfeldt– Jakob disease. *Eur. J. Neurol.* 23(5): 871-877.
27. Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature.* 383 (6602): 685-690.
28. Corona, C., Vallino Costassa, E., Iulini, B., Caramelli, M., Bozzetta, E., Mazza, M., Desiato, R., Ru, G., & Casalone, C. (2017). Phenotypical Variability in Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiology, Pathogenesis, and Diagnosis of Classical and Atypical Forms. *Progress in molecular biology and translational science*, 150, 241–265.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.06.015>
29. Cortez LM, Sim VL. Implications of prion polymorphisms. *Prion.* 2013. (4):276-9. doi: 10.4161/pri.25566.
30. Costassa, E. V., Iulini, B., Mazza, M., Acutis, P., Maurella, C., Meloni, D., Pautasso, A., Capucci, L., Bozzetta, E., Simmons, M. M., Zanusso, G., Pocchiari, M., Corona, C., & Casalone, C. (2016). Pathogenesis and Transmission of Classical and Atypical BSE in Cattle. *Food safety (Tokyo, Japan)*, 4(4), 130–134. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2016018>
31. Curcio, L., Sebastiani, C., Di Lorenzo, P., Lasagna, E., & Biagetti, M. (2016). Review: A review on classical and atypical scrapie in caprine: Prion protein gene polymorphisms and their role in the disease. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 10(10), 1585–1593.
<https://doi.org/10.1017/S1751731116000653>
32. Dalai, W., Matsuo, E., Takeyama, N., Kawano, J., Saeki, K. (2017). Increased expression of prion protein gene is accompanied by demethylation of CpG sites in a mouse embryonal carcinoma cell line, P19C6. *The Journal of veterinary medical science*, 79(3), 644–648. doi:10.1292/jvms.16-0554
33. Dalai, W., Matsuo, E., Takeyama, N., Kawano, J., Saeki, K. (2016). CpG site DNA methylation patterns reveal a novel regulatory element in the mouse prion protein gene. *The Journal of veterinary medical science*, 79(1), 100–107. doi:10.1292/jvms.16-0390

34. Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Seiser, C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol. Cell. Biol.* 19(8): 5504-5511.
35. Ducrot, C., Arnold, M., De Koeijer, A., Heim, D., Calavas, D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet. Res.* 39(4): 1-18.
36. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2014). Scientific opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats. *EFSA J.* 12, 3781.
37. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2010). Scientific opinion on BSE/TSE infectivity in small ruminant tissues. *EFSA J.* 8, 1875.
38. Elmonir, W., Inoshima, Y., Elbassiouny, A., & Ishiguro, N. (2010). Intron 1 mediated regulation of bovine prion protein gene expression: Role of donor splicing sites, sequences with potential enhancer and suppressor activities. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(4), 706-710.
39. ENSEMBL. <http://www.ensembl.org> Fecha de consulta 23 de agosto de 2021
40. Espinosa, J.C., Morales, M., Castilla, J., Rogers, M., Torres, J.M., 2007. Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *J. Gen. Virol.* 88, 1379–1383.
41. Eraña, H. (2015). Estudio de los determinantes moleculares que modulan la resistencia del conejo a la infección por priones utilizando un modelo de propagación in vitro. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. 202 pp.
42. Faris, R., Moore, R. A., Ward, A., Race, B., Dorward, D. W., Hollister, J. R., Fischer E., Priola, S. A. (2017). Cellular prion protein is present in mitochondria of healthy mice. *Sci. Rep.* 7: 41556.
43. Ghani, A. C., Ferguson, N. M., Donnelly, C. A., Anderson, R. M. (2000). Predicted vCJD mortality in Great Britain. *Nature.* 406(6796): 583-584.
44. Gough, K. C., y Maddison, B. C. (2010). Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*, 4(4), 275–282. doi:10.4161/pri.4.4.13678
45. Goldmann, W. (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet. Res.* 39:30.
46. Goldgaber, D., Goldfarb, L. G., Brown, P., Asher, D. M., Brown, W. T., Lin, S., Boellaard, J. W. (1989). Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome. *Exp. Neurol.* 106(2): 204-206.

47. Guan, F., Song, X.M., Li, J., Wang, H.X., Liu, Y.X., Jiang, J.F., Zheng, H.C. & Jiang, Y.Q. (2014) Effects of PRNP polymorphisms on sperm quality traits in Chinese Holstein bulls, *Journal of Applied Animal Research*, 42:3, 284-288, DOI: 10.1080/09712119.2013.842486
48. Gurgul, A., Polak, M. P., Larska, M., Słota, E. (2012). *PRNP* and *SPRN* genes polymorphism in atypical bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in Polish cattle. *J. Appl. Genet.* 53(3): 337-342.
49. Haigh, C. L., Wright, J. A., Brown, D. R. (2007). Regulation of prion protein expression by noncoding regions of the PRNP gene. *J. Mol. Biol.* 368(4): 915-927.
50. Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G.G., Bayley, P. M. (2004). The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J. Mol. Biol.* 336(5): 1175-1183.
51. Halliez, S., Passet, B., Martin-Lannerée, S., Hernandez-Rapp, J., Laude, H., Mouillet-Richard, S., Vilotte, J.C., Béringue, V. (2014). To develop with or without the prion protein. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2:58
52. Harris, D. A., Lele, P., Snider, W. D. (1993). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(9): 4309-4313.
53. Haase, B., Doherr, M., Seuberlich, T., Drögemüller, C., Dolf, G., Nicken, P., Schiebe, K., Ziegler, U., Groschup, M., Zurbriggen, A., Leeb, T. (2007) PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet.* 8:15.
54. Heaton, M. P., Keele, J. W., Harhay, G. P., Richt, J. A., Koohmaraie, M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Casas, E., King, D. A., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Neiberghs, H. L., Chase, C. C., Jr, Kalbfleisch, T. S., Smith, T. P., Clawson, M. L., & Laegreid, W. W. (2008). Prevalence of the prion protein gene E211K variant in U.S. cattle. *BMC veterinary research*, 4, 25. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-25>
55. Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl JP, Aguzzi A. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med.* 2001;7:976–977. doi: 10.1038/nm0901-976.
56. Hoffmann, C., Eiden, M., Kaatz, M., Keller, M., Ziegler, U., Rogers, R., Hills, B., Balkema-Buschmann, A., van Keulen, L., Jacobs, J. G., & Groschup, M. H. (2011). BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Veterinary research*, 42(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-21>
57. Hoinville, L. J. (1994). Decline in the incidence of BSE in cattle born after the introduction of the 'feed ban'. *Vet. Rec.* 134(11): 274-275.

58. Hour A, Espinosa JC, Vidal E, Cassard H, Douet JY, Lugan S, Aron N, Marín-Moreno A, Lorenzo P, Aguilar-Calvo P, Badiola J, Bolea R, Pumarola M, Benestad SL, Orge L, Thackray AM, Bujdoso R, Torres JM, Andreoletti O. (2019). The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116(52):26853–62. doi: 10.1073/pnas.1915737116. Epub ahead of print. PMID: 31843908; PMCID: PMC6936354.
59. Houston F, Andreoletti O. Animal prion diseases: the risks to human health. *Brain Pathol*. 2019 Mar;29(2):248-262. doi: 10.1111/bpa.12696. Epub 2019 Jan 22. PMID: 30588682.
60. Hwang, S., & Nicholson, E. M. (2018). Thermodynamic characterization for the denatured state of bovine prion protein and the BSE Associated variant E211K. *Prion*, 12(5-6), 301–309. <https://doi.org/10.1080/19336896.2018.1534485>
61. Imran M, Mahmood S. An overview of human prion diseases. *Virologia*. 2011; 8: 559.
62. Inoue, S., Tanaka, M., Horiuchi, M., Ishiguro, N. Shinagawa, m. (1997). Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *Journal of veterinary medical science*, 59(3), 175-183.
63. Iannuzzi, L., Palomba, R., Di Meo, G. P., Perucatti, A., Ferrara, L. (1998). Comparative FISH-mapping of the prion protein gene (PRNP) on cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Cytogenet. Genome Res*. 81(3-4): 202-204.
64. Iwamaru Y, Imamura M, Matsuura Y, et al. Accumulation of L-type bovine prions in peripheral nerve tissues. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 1151–1154
65. Jeffrey M, Gonzalez L, Espenes A, Press CM, Martin S, Chaplin M, Davis L, Landsverk T, MacAldowie C, Eaton S, McGovern G. Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep. *J Pathol*. 2006;209:4–14. doi: 10.1002/path.1962.
66. Jin, H. J., Skripnitchenko, A., Koo, W. W. (2004). The effects of the BSE outbreak in the United States on the beef and cattle industry. Center for Agricultural Policy and Trade Studies, Department of Agribusiness and Applied Economics, North Dakota State University. Special report 03-4. Disponible en: <http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/23072/1/sr030004.pdf> . Fecha de consulta: 26 de agosto de 2021.
67. Juling, K., Schwarzenbacher, H., Williams, J. L., Fries, R. (2006). A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol*. 4(1): 33.
68. Kaatz, M., Fast, C., Ziegler, U., Balkema-Buschmann, A., Hammerschmidt, B., Keller, M., Oelschlegel, A., McIntyre, L., & Groschup, M. H. (2012). Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain. *The American journal of pathology*, 181(2), 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.05.001>

69. Kerber, A. R., Hepp, D., Passos, D. T., de Azevedo Weimer, T. (2008). Polymorphisms of two indels at the PRNP gene in three beef cattle herds. *Biochem. Genet.* 46(1-2): 1-7.
70. Kim, Y. C., Jeong, B. H. (2017). Lack of germline mutation at codon 211 of the prion protein gene (PRNP) in Korean native cattle. *Acta. Vet. Hung.* 65(1): 147-152.
71. Konold, T., Phelan, L. J., Clifford, D., Chaplin, M. J., Cawthraw, S., Stack, M. J., Simmons, M. M. (2014). The pathological and molecular but not clinical phenotypes are maintained after second passage of experimental atypical bovine spongiform encephalopathy in cattle. *BMC Vet. Res.* 10(1): 243.
72. Konold, T., Spiropoulos, J., Chaplin, M. J., Stack, M. J., Hawkins, S. A. C., Wilesmith, J. W., Wells, G. A. H. (2013). Unsuccessful oral transmission of scrapie from British sheep to cattle. *Vet. Rec.* 173(5): 118-118.
73. Küffer, A., Lakkaraju, A. K., Mogha, A., Petersen, S. C., Airich, K., Doucerain, C., Marpakwar, R., Bakirci, P., Senatore, A., Monnardi, A., Schiavi, C., Nuvolone, M., Grosshans, B., Homemann, S., Bassilana, F., Monk K.R., Aguzzi, A. (2016). The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Gpr126/Adgrg6. *Nature.* 536(7617): 464.
74. Lee, J., Kim, S. Y., Hwang, K. J., Ju, Y. R., & Woo, H. J. (2013). Prion diseases as transmissible zoonotic diseases. *Osong public health and research perspectives*, 4(1), 57–66.
<https://doi.org/10.1016/j.phrp.2012.12.008>
75. Lee, H. S., Sambuughin, N., Cervenakova, L., Chapman, J., Pocchiari, M., Litvak, S., Brown, P. (1999). Ancestral origins and worldwide distribution of the PRNP 200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64(4): 1063-1070.
76. Lee DK, Suh D, Edenberg HJ, Hur MW. (2002). POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J. Biol. Chem.* 277: 26761-26768.
77. Leeming, J., Turner, P. (2004). The BSE crisis and the price of red meat in the UK. *Appl. Econ.* 36(16): 1825-1829
78. López Garcia, F., Zahn, R., Riek, R., & Wüthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8334–8339. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8334>
79. Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development.* 115(1): 117-122.

80. Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., Manuelidis, L., Manuelidis, E. E. (1983). Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt–Jakob disease. *Nature*. 306(5942): 474-476.
81. Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol*. 54(1): 63-74.
82. Morgan, N. (2001). Repercussions of BSE on international meat trade. Global market analysis. Commodities and Trade Division. Food and Agriculture Organisation. June. Disponible en: <http://www.fao.org/livestock/agap/frg/Feedsafety/pub/morgan%20bse.doc>. Fecha de consulta 26 de agosto de 2021.
83. Msalya, G., Shimogiri, T., Nishitani, K., Okamoto, S., Kawabe, K., Minesawa, M., Maeda, Y. (2010). Indels within promoter and intron 1 of bovine prion protein gene modulate the gene expression levels in the medulla oblongata of two Japanese cattle breeds. *Anim. Genet*. 41(2): 218-221.
84. Murdoch, B. M., Murdoch, G. K. (2015). Genetics of prion disease in Cattle. *Bioinform. Biol. Insights*. 9(Suppl 4): 1-10.
85. Murdoch, B. M., Murdoch, G. K., Settles, M., McKay, S., Williams, J. L., & Moore, S. S. (2011). Genome-wide scan identifies loci associated with classical BSE occurrence. *PloS one*, 6(11), e26819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026819>
86. Murdoch, B. M., Clawson, M. L., Yue, S., Basu, U., McKay, S., Settles, M., Capoferri, R., Laegreid, W. W., Williams, J. L., Moore, S. S. (2010). PRNP haplotype associated with classical BSE incidence in European Holstein cattle. *PLoS One*, 5(9): e12786.
87. Nakamitsu, S., Miyazawa, T., Horiuchi, M., Onoe, S., Ohoba, Y., Kitagawa, H., Ishiguro, N. (2006). Sequence variation of bovine prion protein gene in Japanese cattle (Holstein and Japanese Black). *J. Vet. Med. Sci*. 68(1): 27-33.
88. Nakamura, I., Xue, G., Sakudo, A., Saeki, K., Matsumoto, Y., Ikuta, K., & Onodera, T. (2007). Novel single nucleotide polymorphisms in the specific protein 1 binding site of the bovine *PRNP* promoter in Japanese Black cattle: impairment of its promoter activity. *Intervirology*, 50(3), 190-196.
89. Nicolas, O., Gavín, R., José, A. (2009). New insights into cellular prion protein (PrP^c) functions: The “ying and yang” of a relevant protein. *Brain Res. Rev*. 61(2): 170-184.
90. Nuvolone, M., Hermann, M., Sorce, S., Russo, G., Tiberi, C., Schwarz, P., Minikel, E., Despina Sanoudou, D., Pelczar, P., Aguzzi, A. (2016). Strictly co-isogenic C57BL/6J-PRNP^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science. *J. Exp. Med*. 213 (3): 313-327

91. Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Leroy, E.H., Prusiner, S. B, Weissmann, C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40(4): 735-746.
92. Okada H, Miyazawa K, Fukuda S, et al. The presence of disease-associated prion protein in skeletal muscle of cattle infected with classical bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Med Sci.* 2014; 76: 103–107
93. Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Shimizu, Y., Kasai, K., Mohri S., Yokoyama, T., Czub, S. (2011). Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial-and stellate-type prion protein deposits. *Vet. Res.* 42(1): 79.
94. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A. N. A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R., Cohen F.E., Prusiner, S.B. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(23): 10962-10966.
95. Peralta, O. A., Huckle, W. R., & Eyestone, W. H. (2012). Developmental expression of the cellular prion protein (PrP(C)) in bovine embryos. *Molecular reproduction and development*, 79(7), 488–498. <https://doi.org/10.1002/mrd.22057>
96. Peralta, O. A., y Eyestone, W. H. (2009). Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP(C)) expression in bovine somatic tissues. *Prion*, 3(3), 161–170
97. Pattison, J. (1998). The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 4(3): 390.
98. Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell.* 35(2): 349-358.
99. Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 216(4542): 136-144.
100. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., Wüthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23–231). *FEBS Lett.* 413(2): 282-288.
101. Robinson SJ, Samuel MD, O'Rourke KI, Johnson CJ. (2012). The role of genetics in chronic wasting disease of North American cervids. *Prion.* 2012 Apr-Jun;6(2):153-62. doi: 10.4161/pri.19640.
102. Robinson AL, Williamson H, Güere ME, Tharaldsen H, Baker K, Smith SL, Pérez-Espona S, Krojerová-Prokešová J, Pemberton JM, Goldmann W, Houston F. (2019). Variation in the prion

protein gene (PRNP) sequence of wild deer in Great Britain and mainland Europe. *Vet Res.* 50, 59 <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0675-6>.

103. Richt, J. A., Hall, S. M. (2008). BSE case associated with prion protein gene mutation. *PLoS Pathog.* 4(9): e1000156.
104. Rzewucka-Wójcik E, Frost A, Jędrzejczak M, Zaborski D, Pilarczyk R, Szatkowska I, Wójcik J, Grzesiak W, Dybus A. 2013. The PRNP ins/del and octapeptide repeat polymorphisms in Jersey cattle and their associations with production traits. *J Appl Anim Res.* 41(2):244–248.
105. Sanches CC, Rosinha G, Galvão CE, Feijó GL, Araújo FR, Soares CO. 2016. Polymorphisms in the Prion Protein Gene of cattle breeds from Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 36(11): 1059-1066. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016001100001>
106. Sánchez-Valle, R., Yagüe, J., Turón, A., Aróstegui, J. I., Nos, C., Rey, M., Ferrer I., Gelpi, E. (2012). Inherited prion disease with 4-octapeptide repeat insertion linked to valine at codon 129. *Brain.* 135(4): 212-212.
107. Sander, P., Hamann, H., Drögemüller, C., Kashkevich, K., Schiebel, K., Leeb, T. (2005). Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J. Biol. Chem.* 280(45): 37408-37414.
108. Sander, P., Hamann, H., Pfeiffer, I., Wemheuer, W., Brenig, B., Groschup, M. H., Leeb, T. (2004). Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics.* 5(1): 19-25.
109. Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey M.W., Morris, R. (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* 22(14): 3591-3601.
110. Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene*, 238(2), 291-300.
111. Taylor, D. M., Woodgate, S. L., y Atkinson, M. J. (1995). Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Vet. Rec.* 137(24): 605-610.
112. Terry, L.A., Marsh, S., Ryder, S.J., Hawkins, S.A.C., Wells, G.A.H., Spencer, Y.I. (2003). Detection of disease specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 152, 387–392
113. Tichopad A, Pfaffl MW, Didier A. Tissue-specific expression pattern of bovine prion gene: quantification using real-time RT-PCR. *Molecular and cellular probes.* 2003. 17(1), 5-10.

114. Torres, J.-M.; Andréoletti, O.; Lacroux, C.; Prieto, I.; Lorenzo, P.; Larska, M.; Baron, T.; Espinosa, J.-C. (2011). Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of h-type prion in homologous prion protein context. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1636–1644.
115. Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., R.G, Taraboulos A., Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(25): 14945-14949.
116. Vilotte, J.L., Soulier. S., Essalmani, R., Stinnakre, M.G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J.C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M.F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J. Virol.* 75: 5977-5984.
117. Weissmann, C. (1999). Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Biol. Chem.* 274(1): 3-6.
118. Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121(18): 419-420.
119. Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123(25): 638-644.
120. Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128(9): 199-203.
121. Won, S. Y., Kim, Y. C., & Jeong, B. H. (2020). First Report of the Potential Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Related Somatic Mutation E211K of the Prion Protein Gene (*PRNP*) in Cattle. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4246.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124246>
122. Xue, G., Aida, Y., Onodera, T., & Sakudo, A. (2012). The 5' flanking region and intron1 of the bovine prion protein gene (*PRNP*) are responsible for negative feedback regulation of the prion protein. *PLoS one*, 7(3), e32870.
123. Xue G., Sakudo A., Kim C.K. y Onodera T. (2008). Coordinate regulation of bovine prion protein gene promoter activity by two Sp1 binding site polymorphisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372:530-535.
124. Yamakawa, Y., Hagiwara, K. I., Nohtomi, K., Nakamura, Y., Nishijima, M., Higuchi, Y., Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health. (2003). Atypical Proteinase K-Resistant Prion Protein (PrPres) Observed in an Apparently Healthy 23-Month-Old Holstein Steer. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56(5/6): 221-222.

125. Yang, Q., Zhang, S., Liu, L., Lei, C., Qi, X., Lin, F., Qu, W., Qi, X., Liu, J., Wang, R., Chen, H. & Lan, X. (2018). The evaluation of 23-bp and 12-bp insertion/deletion within the *PRNP* gene and their effects on growth traits in healthy Chinese native cattle breeds, *Journal of Applied Animal Research*, 46:1, 505-511, DOI: [10.1080/09712119.2017.1348950](https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1348950)
126. Zhu, X. Y., Feng, F. Y., Xue, S. Y., Hou, T., Liu, H. R. (2011). Bovine spongiform encephalopathy associated insertion/deletion polymorphisms of the prion protein gene in the four beef cattle breeds from North China. *Genome*. 54(10): 805-811.
127. Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J. D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M. T., Liautard, J. P. (2007). Physiological role of the cellular prion protein. *Vet. Res.* 39(4): 1