

Patologías producidas por priones.

Gustavo Farías*, Paula Núñez, Danielle Padilla, José Goicoechea

Laboratorio de Fisiopatología y Toxicología, Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
Santa Rosa 11.735, La Pintana, Santiago, CHILE.
gfarías@uchile.cl

Resumen

Se describe un grupo de patologías neurodegenerativas fatales que afectan a los animales y al hombre, denominadas Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) o enfermedades causadas por priones. Entre ellas, destaca la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), que se diagnosticó en Gran Bretaña en 1986 y que posteriormente ha afectado a otros países. Esta patología ha producido grandes daños en la salud animal, así como también a la economía y salud pública de estos países, ya que se le considera una zoonosis. Otras EETs en los animales, son el Scrapie de los ovinos y caprinos, la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV), la Enfermedad del Desgaste Crónico (EDC) en ciervos y alces y la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) en felinos. En el hombre, también se han descrito distintas EETs, pero sin duda la que tiene mayor impacto actualmente es la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (ECJ), y su nueva variante vECJ por su relación con la EEB.

Entre las características comunes de estas patologías, se incluyen su curso con un largo periodo de incubación, los signos neurológicos progresivos y los cambios morfológicos degenerativos del sistema nervioso central, que terminan con la muerte del individuo. El agente causante de estas enfermedades se denomina prión (partícula infecciosa proteinacea), que corresponde a la forma alterada de una proteína celular (PrPC) que adquiere la capacidad de transformar la proteína normal en patológica (PrPSc).

Abstract

A group of fatal neurodegenerative diseases is described, that affect animals and humans, called Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE's) or prion diseases. In this group of diseases is distinguished the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), diagnosed in the United Kingdom in 1986, and that later has affected other Europe countries. This disease has produced great damages to the animal health, as to the economy and the public health of these countries, because is considered as a zoonosis. Other TSE's of animals is Scrapie of sheep and goats, Transmissible Mink Encephalopathy (TME), Chronic Wasting Disease (CWD) in deer and elks and the Feline Spongiform Encephalopathy. In humans also have been described different TSE's, but with no place to doubt, the one with greatest impact up to date is the Creutzfeldt Jacob Disease (CJD), and it's new variant vCJD because of it's implication with BSE.

Within the common characteristics of this diseases are included a large incubation time, progressive neurological signs and degenerative morphological changes of the central nervous system (CNS); which finishes with the death of the individual. The etiologic agent of this

diseases is called prion (proteinaceous infectious particle), that is an altered form of a cellular protein (PrPC) that acquires the capacity of transforming the normal protein into a pathological one (PrPSc).

Palabras claves: Priones, Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, EEB, Scrapie.

Introducción

Las EETs o enfermedades producidas por priones son un grupo de patologías neurodegenerativas fatales que afectan al hombre y a los animales. Estas enfermedades incluyen una fase psíquica, con cambios de comportamiento y de temperamento, además de una fase orgánica en la que se observan alteraciones motoras graves (Torres et al., 2001; Will, 2002).

Entre las EETs de los animales, destaca la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) conocida como la “enfermedad de las vacas locas”. Esta patología ha tenido gran impacto en la salud animal así como también, ha causado grandes pérdidas económicas en este rubro. Además, ha adquirido gran importancia en salud pública, debido a que se ha descrito su transmisión al hombre, dando origen a una nueva variante de ECJ (vECJ), por lo que se le considera una enfermedad zoonótica (Will, 2002; Buschmann et al., 2004; Llewelyn et al., 2004).

Las EETs, se caracterizan por cursar con un elevado tiempo de incubación, signos neurológicos progresivos y cambios morfológicos degenerativos en el sistema nervioso central (SNC), que terminan con la muerte del individuo (Torres et al., 2001). La teoría más aceptada sobre el agente causante de estas enfermedades es la del

prión, que corresponde a la forma alterada de una proteína celular (PrPC) que ha adquirido la capacidad de transformar la forma normal en patológica (PrPSc). Este agente es capaz de propagarse en el sistema nervioso de un mismo huésped causando una lesión espongiforme degenerativa en este tejido, además de transmitirse de un huésped a otro con largos tiempos de incubación (Gasset y Westaway, 2001). Las EETs se clasifican en enfermedades de tipo hereditarias, cuando su presentación se debe a una mutación en el gen que codifica la PrP; de tipo adquiridas, cuando la infección es producto del ingreso al organismo de una PrPSc exógena; y de tipo esporádicas, cuando se presentan sin evidencia de una mutación puntual o de infección exógena con la PrPSc (Lasmezas, 2003).

Patogenia

Durante muchos años, los científicos se refirieron al agente infeccioso que causaba las EETs como un virus lento, debido a su larga progresión y a las propiedades inusuales que presentaba. Tal como los virus lentos, este agente atípico de las EETs muestra un tropismo por los sistemas nervioso y linfóide reticular, adaptándose así a nuevos huéspedes y abarcando diversos grados de patogenicidad (Lasmezas, 2003; Monleon et al., 2004). Sin embargo, la extrema resistencia del agente de las EETs a

la acción de la radiación ultravioleta e ionizante, entre otras de sus características, aumentó el interés de los investigadores respecto a la naturaleza de este agente (DeArmond y Prusiner, 1995).

Es así como Prusiner en el año 1981, descubrió que la fracción infecciosa contenía una proteína hidrofóbica que co-purificaba con la infectividad. El planteó que esta proteína era el agente infeccioso y la denominó prión, que es la abreviación de “partícula infecciosa proteinacea” (Prusiner, 1991; Lasmezas, 2003). Así, el término prión fue introducido para distinguir al patógeno causante del Scrapie de los virus y viroides, al descubrir que su infectividad no era atenuada por procedimientos que modifican ácidos nucleicos e inactivan a los virus, pero sí por tratamientos que alteran proteínas (DeArmond y Prusiner, 1995). Además, los priones no provocan una respuesta inflamatoria responsable de antigenicidad detectable en el huésped (Torres et al., 2001; Lasmezas, 2003).

Los priones corresponden a una proteína denominada PrP^{Sc} (isoforma Scrapie), que se produce por el plegamiento erróneo de una proteína celular normal (PrP^C) con idéntica secuencia de aminoácidos (33-35 kDa), que está presente en prácticamente todos los tejidos del organismo. La PrP^C, al enfrentarse a una proteína patológica, sufre un cambio conformacional post-traducciona que la convierte en PrP^{Sc}, sin modificar su estructura primaria. Este cambio consiste en la adquisición de un mayor porcentaje de conformación β laminar. Así, la PrP^C presenta una estructura con un 3% β laminar y un 42% de α hélices, mientras que la

PrP^{Sc} tiene una estructura con un 43% de conformación β laminar y un 30% de α hélices. Este plegamiento erróneo, confiere a la PrP^{Sc} dos propiedades que permiten diferenciarla de la PrP^C, la resistencia parcial a la digestión con proteasas y la insolubilidad (Torres et al., 2001; Brun et al., 2004). Bajo el tratamiento con proteinasa K, la PrP^C se destruye completamente, mientras que la PrP^{Sc} reduce su tamaño original a 27-30 kDa. El fragmento remanente de PrP^{Sc} proteasa resistente, la PrP 27-30, posee un mayor porcentaje β laminar, un 54% y un menor contenido de α hélices, sólo un 21% (DeArmond y Prusiner, 1995). De esta forma, la PrP 27-30 se deposita en el intracelular en el sistema nervioso formando fibras, denominadas fibras asociadas a Scrapie (SAF), que se pueden observar mediante microscopía electrónica. La acumulación de las SAF en el SNC es lo que conduce a la degeneración y muerte neuronal (Dourmashkin et al., 2004; Lezmi et al., 2004).

La proteína priónica patógena se caracteriza por su alta resistencia a la inactivación por nucleasas, radiación UV, tratamiento con psoralenos, cationes divalentes, iones metálicos quelantes, ácidos (entre pH 3 y 7), hidroxilamina, formalina, ebullición y proteasas. La infectividad de los priones se puede disminuir mediante la digestión prolongada con proteasas, con tratamientos como úrea, ebullición con SDS, álcali (pH > 10), autoclave a 132°C durante más de 2 horas, solventes orgánicos denaturantes (fenol), o agentes caotrópicos como el isocianato de guanidina (Torres et al., 2001). El hecho que demostró la necesidad de la presencia de la isoforma celular para la

producción de la proteína infectiva, es la resistencia de los ratones *knock out* (que no expresan la PrPC) tras la inoculación intracerebral de PrPSc (Castilla et al., 2002; Dormont, 2002; Brun et al., 2003).

Respecto a la expresión del gen de la PrPC, ésta ocurre constitutivamente en tejidos neuronales y no neuronales de animales adultos, detectándose los niveles más altos en las neuronas (Lasmezas, 2003). Así la PrPC se encuentra principalmente en cerebro, particularmente en el hipocampo, existiendo además niveles significativos en corazón y músculo esquelético y más bajos en la mayoría de los órganos restantes (Gasset y Westaway, 2001; Monleon et al., 2004).

Se ha demostrado que la PrPC es altamente tóxica si se acumula en el citosol, cuando esto se produce, se hacen insuficientes los mecanismos celulares encargados de la degradación de proteínas aberrantes o anómalas y se induce la muerte celular por apoptosis. La acumulación puede facilitarse por la presencia de mutaciones que afectan la estabilidad de la conformación de la PrPC, como ocurre en los casos de EET hereditarias, o bien por la interacción con una PrPSc exógena, como ocurre en las infecciones naturales o en las inoculaciones experimentales (Harris, 1999; Castilla et al., 2002).

La PrPSc es la proteína responsable de la disfunción del SNC y de la neuropatología de las enfermedades priónicas al acumularse en las neuronas. Existe evidencia sustancial que demuestra que esta acumulación precede a la vacuolización y a la gliosis astrocítica,

lesiones que han sido consideradas las características neuropatológicas de estas patologías. Sin embargo, los mecanismos precisos que culminan con el daño a las células cerebrales son aún desconocidos (Prusiner, 1991; Lasmezas, 2003; Brun et al., 2004; Dourmashkin et al., 2004).

Las moléculas de PrPSc, al agregarse, forman placas amiloides (DeArmond y Prusiner, 1995). Este proceso podría ser asistido por una chaperona molecular u otro factor desconocido del huésped, referido como un factor o proteína X (Prusiner et al., 1998; Lasmezas, 2003) que interactúa en una vía especie específica con el C-terminal de la PrPC durante la propagación priónica. Si estas chaperonas fueran célula-específica, se podría explicar la propagación selectiva de los priones en distintas poblaciones neuronales y en tipos particulares de células periféricas como las del sistema linfático reticular (Harris, 1999; Brun et al., 2004; Monleon et al., 2004). La propagación de la infectividad de los priones es un proceso exponencial, en el cual una molécula de PrPSc al combinarse con una molécula de PrPC produce un heterodímero que es subsecuentemente transformado en dos moléculas de PrPSc. En la siguiente fase, estas dos PrPSc combinadas con otras dos PrPC originan cuatro moléculas de PrPSc, prosiguiendo así el ciclo de propagación (Prusiner, 1991; 1998).

Los factores que condicionan la tasa de formación de PrPSc y los tiempos de incubación de la patología corresponden a:

- la concentración de PrPSc, que es inversamente proporcional al largo del período de incubación;
- la secuencia de

ambas isoformas de PrP, ya que sí las dos isoformas son idénticas, el tiempo de incubación es menor; - la cepa o tipo de conformación de la PrPSc, ya que algunas cepas de priones exhiben un mayor tiempo de incubación que otras, lo que aún no ha podido ser explicado (Prusiner *et al.*, 1998).

La posibilidad de transmisión de los priones entre las distintas especies ha permitido definir el concepto de barrera interespecífica. En relación a esta, se sabe que la secuencia aminoacídica primaria de la PrPC es la determinante principal (Glatzel y Aguzzi, 2000). Así la transmisión de los priones entre distintas especies se define como un proceso estocástico, que en el caso de ocurrir es muy poco eficaz y se manifiesta con una prolongación del tiempo de incubación hasta la aparición de los signos clínicos. Sin embargo, después de subsiguientes pasajes o adaptación, estos tiempos se acortan y estabilizan, por lo que la transmisión deja de ser un proceso probabilístico. Los priones sintetizados de *novoo* reflejan la secuencia del gen de la PrP del huésped o de forma endógena (Gasset y Westaway, 2001; Torres *et al.*, 2001).

Aún cuando el gen de la PrPC está muy conservado entre las distintas especies, siempre presenta algunas diferencias puntuales, las cuales serían las responsables de la barrera interespecífica de los priones. Esto influye, tanto en el comportamiento del prión (replicación, síntesis de PrPSc, tiempo de incubación, alteraciones neuropatológicas) así como, en que la susceptibilidad de una especie a la infección con un prión este determinada por la

homología de las secuencias entre la PrPSc y la PrPC (Torres *et al.*, 2001).

La vía natural de infección para algunas EETs, incluyendo la vECJ, es la vía oral. Epidemiológicamente, esta ruta es muy relevante porque sería la responsable de la epidemia de la EEB y de la transmisión de esta enfermedad a una variedad de especies incluyendo al hombre (Glatzel y Aguzzi, 2000; Weissman *et al.*, 2002; Will, 2002; Llewelyn *et al.*, 2004).

En modelos experimentales, se ha podido determinar que la vía más efectiva para la contaminación con PrPSc exógena es la vía intracerebral, y que la menos efectiva es la vía oral. Sin embargo, en la infección natural con la PrPSc, especialmente en el caso de la EEB, se ha determinado que puede ser más infecciosa la vía periférica de contaminación (incluyendo la oral) más que la vía intracerebral (Dormont, 2002; Huang y Macpherson, 2004).

Una de las principales características de las EETs, en cualesquiera de las especies afectadas, es el largo período de incubación. Esto se podría explicar por la propagación de los priones en los tejidos llamados "reservorios". Muchos estudios apuntan a la importancia de la replicación de los priones en órganos linfoides precediendo a la propagación en el SNC, aunque la vía de infección sea la intracerebral (Glatzel y Aguzzi, 2000; Lezmi *et al.*, 2004). La presencia del prión en el cerebro, después de la administración oral o periférica de PrPSc, implica que las vías de neuroinvasión deben ser aquellas que inervan los tejidos extraneurales donde los niveles de expresión

de PrPC permitan su transformación y acumulación. En el caso de una ingestión por vía oral, parece clara la implicancia de los plexos mesentéricos y submucosos del tracto intestinal, los que se encuentran próximos a órganos del sistema linfoide reticular asociado al tracto digestivo (placas de Peyer intestinales y nódulos linfoides mesentéricos) (Glatzel y Aguzzi, 2000; Brun et al., 2003). En ratones inoculados oralmente con priones de Scrapie o de EEB, estos órganos constituyen los sitios iniciales de replicación (Weissman et al., 2002; Brun et al., 2003).

La importancia de los tejidos linfoides en la patogénesis de las EETs parece estar en función del tipo de prión o de la especie hospedadora. En el hombre, la presencia de PrPSc en el tejido linfoide se ha asociado principalmente con la vECJ. Sin embargo, no se ha podido demostrar la función de los tejidos linfoides en la patogénesis natural de la EEB, pese a la relación causal entre ambas patologías (Weissman et al., 2002; Brun et al., 2003; Huang y MacPherson, 2004; Llewelyn et al., 2004).

El análisis de la infectividad en los diferentes órganos de animales infectados experimentalmente y escogidos en distintos puntos de tiempo post-infección ha demostrado que la neuroinvasión ocurre cerca de la mitad del período de incubación (Weissman et al., 2002; Lasmezas, 2003). Es así como, la propagación de los priones y los primeros cambios patológicos como la espongirosis, aparecen en el centro de la médula espinal torácica, al mismo nivel donde los nervios del sistema nervioso simpático (SNS) entran a la médula espinal.

Posterior a estos hallazgos, se descubrió una vía de acceso adicional al SNC, la que utiliza nervios del sistema nervioso periférico (SNP) a través del nervio vago, llegando de este modo a la médula oblonga. Esta ruta alternativa ha mostrado tener una gran importancia cuando los animales son infectados por vía oral, por lo que la vía de entrada del agente infeccioso parece ser el factor más importante y que determina la ruta preferencial de transporte al SNC (Glatzel y Aguzzi, 2000; Hur et al., 2002).

Patologías priónicas humanas

Las enfermedades priónicas que afectan al hombre se presentan como patologías de tipo esporádicas, hereditarias o desórdenes neurodegenerativos transmisibles. Además pueden ser subdivididas sobre la base de la signología clínica y por las características neuropatológicas con que se manifiestan. Estas corresponden al Kurú, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el Insomnio Familiar Fatal (IFF), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y últimamente una nueva variante vECJ la que, a diferencia de las anteriores, se relaciona directamente con la EEB, por lo que actualmente esta última corresponde a una zoonosis (DeArmond y Prusiner, 1995; Will, 2002; Llewelyn et al., 2004).

Patologías priónicas en animales

Entre las EETs que afectan a los animales, se encuentran el Scrapie que afecta a ovinos y caprinos, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV), la Enfermedad del Desgaste Crónico (EDC) en ciervos y alces, y la Encefalopatía Espongiforme Felina

(EEF) (Wyatt et al., 1990; Ryder et al., 2001; Hur et al., 2002).

Scrapie

Esta patología, que afecta a los ovinos y a los caprinos, fue la primera EET o patología producida por priones reconocida en los mamíferos (O.I.E., 2000a; Lasmezas, 2003). La transmisión experimental del Scrapie natural, que es el prototipo animal de las enfermedades priónicas humanas, fue demostrada en 1938 (DeArmond y Prusiner, 1995; Buschmann et al., 2004).

Fue descrita por primera vez en Inglaterra en el año 1732, siendo desde entonces enzoótica en el Reino Unido (Domínguez et al., 1998). Se considera endémica en muchos países europeos y también ha sido reportada en diversos países de otros continentes. Sin embargo, Australia y Nueva Zelanda han mantenido su condición de país libre de Scrapie debido a rigurosas medidas de control (O.I.E., 2000a).

La patogénesis del Scrapie, que ha sido investigada en rumiantes y en modelos roedores, revela la existencia de una susceptibilidad genética para estas patologías que, combinada con un componente infeccioso, determinaría las características de presentación de la enfermedad. También ha sido transmitida experimentalmente a otros rumiantes, primates y gatos (Lasmezas, 2003; Dourmashkin et al., 2004).

La transmisión puede ocurrir en forma vertical y horizontal. Así, la infección de los corderos ocurre en el momento del parto y posiblemente en el período prenatal. Las membranas fetales son una fuente importante de transmisión entre animales no

emparentados, especialmente cuando las zonas de parto están en áreas confinadas (Domínguez et al., 1998; O.I.E., 2000a). A pesar de que la causa del Scrapie reside en un agente infeccioso, es un gen ovino y caprino específico, denominado Sip (Scrapie incubation period) el que influye en la duración del período de incubación y en la sensibilidad al Scrapie natural y experimental (Domínguez et al., 1998; Castilla et al., 2002).

El período de incubación de esta enfermedad fluctúa entre los 14 y 22 meses (Torres et al., 2001). La mayoría de los casos clínicos se presentan en animales entre los 2 a 5 años de edad, siendo rara su presentación en menores de 1 año de edad. Los signos clínicos varían ampliamente en cada animal afectado y tienen un desarrollo muy lento. Los primeros en aparecer, incluyen cambios en el comportamiento y en el temperamento, a lo que sigue la tendencia del animal a rascar y frotar su cuerpo contra objetos fijos, para aliviar el prurito que se presenta. A consecuencia de esto hay pérdida de lana, particularmente sobre el tórax lateral, flancos y cuartos traseros. Otros signos clínicos evidenciables son la pérdida de coordinación, exagerada ingesta de líquido, pérdida de peso, mordeduras en las patas y anomalías en el movimiento, frecuentemente acompañadas de temblores y convulsiones. Los signos clínicos pueden confundirse, especialmente en la fase temprana de la enfermedad, con los de otras patologías, como pseudorabia, rabia, encefalitis por Listeriosis, Maedi-Visna, ectoparasitismos, hipomagnesemia, cetosis e intoxicaciones (O.I.E., 2000a).

Al examen histopatológico los cerebros muestran astrogliosis, vacuolización intracelular y pérdida neuronal. No parece existir una relación entre la cantidad de astrogliosis observada y la gravedad de las lesiones vacuolares, por lo que ambos cambios parecen representar respuestas primarias independientes (Castilla et al., 2002; Buschmann et al., 2004; Lezmi et al., 2004).

Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)

Esta patología fue descrita en el año 1985, en un bovino Frison en el sur de Inglaterra. Se presentó como un síndrome neurológico que se inició con hipersensibilidad crónica, descoordinación marcada y cambio de carácter acompañado de comportamientos agresivos. Posteriormente en el mismo rebaño se presentaron nuevos casos con los mismos signos clínicos. El análisis histopatológico de los cerebros de estos animales reveló una gran similitud con los cerebros de los animales infectados con Scrapie (Castilla et al., 2002).

La confirmación de que la EEB se originó debido a un agente transmisible asociado a Scrapie, se obtuvo al reproducir satisfactoriamente la patología en ratones, mediante la inoculación intracerebral de material infeccioso de EEB (Wilesmith, 1994; Liberski y Jaskolski, 2002; Buschmann et al., 2004).

La ausencia de un método de diagnóstico práctico y rápido, que permitiera la identificación de animales en fases preclínicas obligó al sacrificio masivo de animales como medida preventiva, lo que hizo necesario profundizar en la etiología,

patogenia y obtención de métodos de diagnóstico para esta enfermedad (Castilla et al., 2002).

La edad promedio de presentación de la EEB es de 5 años de edad, con un rango que va desde los 20 meses hasta los 18 años de edad. El tiempo de incubación hasta el inicio de los signos clínicos, fue estimado como mínimo entre 2,5 a 8 años (Collee y Bradley, 1997).

La EEB tiene un inicio insidioso de la enfermedad clínica y usualmente un curso lento y progresivo. Los animales afectados presentan signología nerviosa, que usualmente incluye cambios de comportamiento, aprehensión e hiperreactividad. Las vacas afectadas pueden ser reacias a entrar a la sala de ordeña o pueden patear vigorosamente durante ésta. En las vacas secas especialmente, la incoordinación y debilidad de los miembros pélvicos puede ser la primera característica observada. Los signos neurológicos predominan en todo el curso clínico de la enfermedad y pueden incluir diversos aspectos de alteración del estado mental así como en el comportamiento, además de anomalías de posturas y movimiento. Sin embargo, los signos nerviosos más comúnmente reportados son: aprehensión, ataxia de los miembros pélvicos e hiperestesia al tacto y sonido. Los animales afectados pueden estar parados con la cabeza agachada, el cuello extendido y las orejas dirigidas hacia atrás, con anomalías en el paso, balanceo e hipermetría en los miembros traseros. La ataxia puede afectar también a los miembros torácicos, con una avanzada severidad de los signos

locomotores y debilidad generalizada, resultando finalmente en caídas que pueden predominar en el cuadro clínico. La disminución de la rumia, bradicardia y disritmias cardíacas, aunque no son signos clínicos específicos, sugieren una alteración del sistema nervioso autónomo (SNA). Características clínicas generales, como pérdida de la condición corporal y reducción de la producción de leche, pueden también acompañar la signología nerviosa (O.I.E., 2000b). La duración de los signos clínicos antes de la muerte es de 1 a 6 meses (Torres et al., 2001).

Al inicio de la enfermedad los signos pueden ser sutiles, variables e inespecíficos. Algunos signos clínicos tempranos de EEB pueden mostrarse similares a los signos nerviosos de otras patologías como cetosis, hipomagnesemia, hipocalcemia, encefalitis por Listeriosis u otras encefalopatías. Los signos sutiles pueden generalmente ser exacerbados debido a estrés, como es el caso del transporte (O.I.E., 2000b).

Los cambios histopatológicos más notorios consisten en vacuolización intracelular y del neuropilo, pérdida neuronal, astrogliosis y formación de placas amiloides ocasionales. La ausencia de variación observada en los patrones de vacuolización del tejido encefálico en el ganado afectado, tanto en infecciones naturales como experimentales, sugirió la posibilidad de que una única cepa de prión pudiera ser la causante de la epidemia de la EEB, lo que también fué apoyado por las características electroforéticas de la PrP 27-30 (Prince et al., 2003). Esto a diferencia de lo ocurrido con las ovejas infectadas con Scrapie, donde

se han podido definir 20 cepas distintas de priones (Castilla et al., 2002; Liberski y Jaskolski, 2002). Sin embargo, en el año 2003, fueron reportadas cepas distintas de EEB en Italia y Japón y en el año 2004 en Francia, mediante una prueba de diagnóstico rutinario (Western Blot). Esta técnica mostró bandas de glicosilación diferentes a las que convencionalmente se detectan en la EEB. Esto podría ser el resultado de una nueva variante del prión introducida en la alimentación del ganado bovino o bien, una aparición espontánea de ella (Willerroider, 2003; Lezmi et al., 2004).

Diagnóstico

La definición de los casos patológicos iniciales de EEB, se basó en los cambios histopatológicos no inflamatorios del SNC, lo que constituyó la base para la confirmación del diagnóstico clínico de la EEB. Además, el examen histopatológico permitió la confirmación de las características fenotípicas neuropatológicas de la EEB. De estas, la más importante corresponde a la vacuolización que incluye un cambio esponjiforme en el neuropilo de la materia gris y una o múltiples vacuolas en el pericarion neuronal. La vacuolización es bilateral y está distribuida simétricamente, con una mayor frecuencia de presentación en ciertos núcleos anatómicos de la médula oblonga ubicados a nivel del óbex. Sin embargo, la observación histopatológica de lesiones dudosas en la médula a este nivel, necesariamente requieren el examen de otras áreas para detectar sobretodo algunos casos de EEB que presentan lesiones mínimas o con lesiones potencialmente atípicas y cuando sea necesario, para establecer diagnósticos diferenciales con otras

patologías. La vacuolización se ubica de preferencia en determinados núcleos del tronco encefálico como son: el dorsal del vago, el del tracto solitario y el dorsal del trigémino, ubicados anatómicamente en la región del óxex. Estos núcleos se han visto afectados en un 99,65% de los casos diagnosticados como positivos a EEB, por lo que esta región anatómica es considerada la más importante para el diagnóstico histopatológico de estas enfermedades (O.I.E., 2000b).

La observación, por microscopía electrónica, de las fibras características de la acumulación de la PrPSc en el SNC, denominadas SAF (fibras asociadas a Scrapie), en extractos detergentes obtenidos de médula espinal fresca o congelada, ha sido utilizada como un método de diagnóstico adicional de la EEB, pero no tiene el mismo nivel de sensibilidad o especificidad de los métodos de inmunodiagnóstico (O.I.E., 2000b; Willerroider, 2003; Dourmashkin *et al.*, 2004).

Los métodos de diagnóstico de la EEB más utilizados actualmente, corresponden a técnicas inmunológicas, que presentan mayor sensibilidad y especificidad al detectar la PrPSc mediante el uso de anticuerpos específicos. Esto ha permitido, realizar el diagnóstico de esta enfermedad en la última fase del período de incubación, es decir, cuando las características clínicas y el daño neurodegenerativo aún no se han manifestado. Estas técnicas, incluso permiten trabajar con tejido cerebral con cierto grado de autólisis (Brun *et al.*, 2004; Buschmann *et al.*, 2004).

Las pruebas denominadas rápidas (Western Blot, ELISA e Inmunohistoquímica), están basadas en la detección inmunológica de la proteína priónica patógena que es parcialmente resistente a la proteinasa K y que, debido a su alta hidrofobicidad, se acumula en el SNC formando las SAF. De esta forma, utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra las PrP se puede detectar la PrPSc resistente a proteinasa K que está presente en los animales afectados con EETs. Tanto los Western Blot como los ELISA, requieren de procesamientos previos de las muestras, consistentes en la homogeneización de los tejidos en tampones adecuados y su posterior digestión con proteinasa K, lo que permite reconocer la PrPSc mediante la inmunoreacción con el primer anticuerpo PrP específico y la reacción inmunológica correspondiente, dependiendo del tipo de prueba utilizada (O.I.E., 2000b; Lezmi *et al.*, 2004). En el caso de la detección de PrPSc por inmunohistoquímica (IHQ), las muestras de tejido nervioso deben ser previamente procesadas y preparadas (fijadas en formalina e incluidas en parafina) para realizar los cortes histológicos, que posteriormente son sometidos a la inmunoreacción utilizando un primer anticuerpo PrP específico y un método de detección adecuado (Hardt *et al.*, 2000; Debeer *et al.*, 2002).

Epidemiología

En 1987 en el Reino Unido se realizó un estudio epidemiológico para investigar las potenciales etiologías que desencadenaron la epidemia de EEB. Aunque las características patológicas de la enfermedad eran similares

a las del Scrapie, se examinaron otras posibles causas. Este estudio incluyó 200 rebaños afectados y el análisis de los resultados eliminaron todas las etiologías y vehículos de infección, excepto el de la alimentación. De ésta, existían dos posibles vías: las harinas de carne y hueso (HCH) y la grasa. La teoría de que las HCH eran el vehículo primario de la EEB, se basó en las propiedades físico-químicas del agente del Scrapie, el cual se distribuye más eficientemente en la fracción proteica de las harinas, que en los lípidos de las grasas. Esto fue también apoyado por la variación geográfica de la incidencia de la enfermedad, que se ajusta más con la distribución geográfica y el manejo de las HCH que con la de los sebos animales (Wilesmith, 1994; Prince et al., 2003).

La hipótesis de la alimentación, fue reforzada por una serie de características de la epidemia en el Reino Unido. La EEB había sido predominantemente una enfermedad de presentación en vacas de lechería más que en los rebaños de carne. A fines del 2002, un 61.7% de los rebaños de lechería del Reino Unido (excluyendo a Irlanda del Norte) habían experimentado al menos un caso de EEB, comparado con un 17.1% de los rebaños de carne (Prince et al., 2003; Williams y Miller, 2003). La diferencia de riesgo entre estos dos grupos, se explica por el mayor uso de concentrado comercial en la alimentación de bovinos de lechería. Además, el riesgo de experimentar un caso de EEB aumenta con el incremento del tamaño del rebaño (Wilesmith, 1994; Prince et al., 2003). Otro aspecto productivo importante de considerar, es que los bovinos de lechería viven más tiempo que los de

carne, lo que les permitiría desarrollar clínicamente la patología (Collee y Bradley, 1997).

Por lo anterior, la investigación se centró en el procesamiento de las HCH y en los cambios que habían ocurrido en su elaboración durante ese periodo. Así, se evidenciaron dos modificaciones básicas en el procesamiento de las HCH, una reducción en el uso de solventes hidrocarbonados para la extracción de las grasas y una mayor eficiencia de energía en los procesos continuos de elaboración. Finalmente, se concluyó que la omisión del uso de algunos solventes en la extracción de las grasas, registrada durante 1981-1982 en las plantas de procesamiento inglesas, llevaron a la presentación de los primeros casos de EEB observados entre 1985-1986, debido a que el agente infeccioso ya no era inactivado (Collee y Bradley, 1997).

Se propuso así que el origen de la infección de la EEB del ganado bovino se originó desde el Scrapie de las ovejas. La teoría estaba basada en un incremento en el tamaño de la población ovina y por consiguiente, un aumento en la cantidad de material que fue procesado, sumado al virtual cese en las prácticas de remoción de los cerebros ovinos antes del procesamiento (Prince et al., 2003).

Distribución geográfica

La EEB se ha presentado en diversos países del mundo, siendo más importante su incidencia en el Reino Unido, involucrando tanto al ganado importado como al autóctono. El origen de los nuevos casos es probablemente debido a la exportación tanto

de ganado infectado como de HCH contaminada desde países con EEB, incluyendo históricamente al Reino Unido (Prince et al., 2003). En la Tabla N°1 se

resumen los casos totales de EEB que se han presentado desde el año 1989 hasta Junio de 2004 (O.I.E., 2004).

Tabla N°1. Casos de EEB (1989 - Junio 2004).

País	Casos Totales	País	Casos Totales	País	Casos Totales
Alemania	312	Austria	1	Bélgica	125
Canadá	2	Dinamarca	13	Eslovaquia	15
Eslovenia	4	España	430	Finlandia	1
Francia	905	Grecia	1	Irlanda	1.400
Israel	1	Italia	117	Japón	11
Liechtenstein	2	Luxemburgo	2	Países Bajos	75
Polonia	15	Portugal	894	Reino Unido	180.231
República Checa	9	Suiza	453		

En algunos países sólo se han reportado casos de EEB únicamente en animales importados como son: Las Islas Malvinas con 1 caso confirmado en el año 1989 y Omán con 2 positivos confirmados ese mismo año. Últimamente, en Diciembre de 2003 se confirmó 1 caso positivo de EEB en USA (O.I.E., 2004).

Encefalopatía transmisible del visón (ETV)

Esta patología, afecta al SNC de visones criados en granjas. Se detectó inicialmente en USA en el año 1947, no volviéndose a presentar nuevos brotes hasta principios del año 1960. Desde entonces se han descrito nuevos casos en Canadá, Europa Occidental y en repúblicas de la antigua Unión Soviética (Castilla et al., 2002).

La fuente de infección es exógena, siendo expuestos los visones a través de alimentos

contaminados con priones. De esta forma, se cree que la causa de algunos brotes es la inclusión en la alimentación, en los visones de crianza, de los desperdicios de mataderos y de cadáveres de animales sin tratar. Sin embargo, aún no ha sido posible demostrar como causa la alimentación con material ovino o bovino infectado en todos los brotes (Lasmezas, 2003).

El período de incubación para esta patología en esta especie es en promedio de 7 meses. Mientras que las características clínicas pueden permanecer entre los 3 días y hasta 6 semanas. Entre los signos más tempranos se observan un aumento de la suciedad de la madriguera y dispersión de residuos por toda la jaula. A medida que la enfermedad progresa, el animal se muestra más excitado y manifiesta una descoordinación severa, con espasmos pronunciados en los miembros traseros (Torres et al., 2001).

La infección natural y experimental muestra una microvacuolización de la materia gris en el córtex cerebelar, cuerpo estriado y cerebro medio (Castilla et al., 2002).

Enfermedad del desgaste crónico (EDC)

Aún cuando el origen de esta patología no se ha dilucidado completamente (Williams y Miller, 2003), está se presenta como una EET que afecta a ungulados domésticos y salvajes. El primer caso se describe en 1967, en un ciervo mula (*Odocoileus hemionus*) cautivo en Colorado. La enfermedad se presentó como una pérdida de peso crónica que terminaba con la muerte del animal. Prácticamente, todos los casos reportados se han presentado en USA y no se ha demostrado transmisión entre la EDC y otras EETs descritas en los animales o en el hombre (Castilla et al., 2002).

Esta patología se presenta en animales de ambos sexos, entre los 2,5 a 7 años de edad. Las características clínicas consisten en una pérdida de peso progresiva, deshidratación, apatía, depresión, ataxia, caída de la cabeza y orejas, sialorrea, polidipsia y poliuria. Además, se altera el comportamiento disminuyendo el temor a los humanos y la interacción con otros individuos del grupo. El animal muere a los 6 meses de aparecer los signos clínicos (Torres et al., 2001).

Los datos recopilados desde las epidemias de EDC en los ungulados cautivos, proveen una fuerte evidencia que la enfermedad es contagiosa y transmitida lateralmente. Sin embargo, el mecanismo exacto de transmisión es aún desconocido (Williams y Miller, 2003). Microscópicamente se observan lesiones en el cerebro y en la médula espinal con microcavitaciones de la

sustancia gris y presencia de placas amiloides (Castilla et al., 2002).

Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF)

Se diagnosticó por primera vez en 1990 en un gato doméstico en Inglaterra (Wyatt et al., 1990). Su incidencia en el Reino Unido es de 10 a 15 gatos infectado en un millón. Además se han descrito casos en pumas, ocelotes y tigres (Ryder et al., 2001). La transmisión de la infección se debería al consumo de alimento contaminado con tejidos de bovinos infectados con EEB (Castilla et al., 2002).

Las manifestaciones clínicas están caracterizadas por alteraciones nerviosas progresivas como tremor muscular generalizado, ataxia, hiperreactividad, dilatación pupilar, las que invariablemente terminan con la muerte del animal. La mayor parte de los casos diagnosticados han aparecido en individuos con una edad comprendida entre los 4 y 9 años. El examen histopatológico revela cambios confinados al SNC, que consisten en vacuolización en la materia gris del cerebro y medula espinal.

Por otra parte, estudios inmunohistoquímicos han evidenciado la presencia de PrPSc en el cerebro y en la médula espinal (Ryder et al., 2001).

Referencias

Brun, A.; Castilla, J.; Rodriguez, F.; Torres, J. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las encefalopatías espongiformes transmisibles. Rev Neurol 2003; 37:648-653.

Brun, A.; Castilla, J.; Ramirez, M.; Prager, K.; Parra, B.; Salguero, F.; Shiveral, D.; Sánchez, C.; Sánchez-Vizcaíno, J.; Douglas, A.; Torres, J. Proteinase K enhanced immunoreactivity of the prion protein-specific monoclonal antibody 2A11. *Neurosc Res* 2004; 48: 75-83.

Buschmann, A.; Biacabe, A.; Ziegler, U.; Bencsik, A.; Madec, J.; Edhardt, G.; Luhken, G.; Baron, T.; Groschup, M. Atypical scrapie exases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid test. *J Virol Meth* 2004; 117:27-36.

Castilla, J.; Brun, A.; Gutierrez-Adan, A.; Pintado, B.; Torres, J. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en especies ganaderas y silvestres. *Invest. Agr Prod Sanid Anim* 2002; 17: 1-15.

Collee, J.; Bradley, R. BSE: a decade on-part I. *Lancet* 1997; 349:636-641.

Dearmond, S.; Prusiner, S. Etiology and Pathogenesis of Prion Diseases. *Am J Pathol* 1995; 146:785-811.

Debeer, S.; Baron, T.; Benesik, A. Transmissible espongiform encephalopathy diagnosis using PrPSc immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 611-616.

Dominguez, A.; Mata, E.; Salleras, L. Prions and transmissible neurodegenerative diseases. *Med Clin* 1998;110: 751-757.

Dormont, D. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Letts* 2002; 529:17-21.

Dourmashkin, R.R.; Oxford, J.S.; Bountiff, L. Immunogold electron microscopy recognizes prion protein-associated particles prepared from scrapie-infected mouse brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63:32-42.

Gasset, M.; Westaway, D. Los priones y su biología. 2001;
<http://www.svneurologia.org/congreso/prion-es-1.html>. [Consulta: 15-04-03].

Glatzel, M.; Aguzzi, A. Peripheral patogénesis of prion diseases. *Microb Infec* 2000; 2:613-619.

Hardt, M.; Baron, T.; Groschup, M. A comparative study immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* 2000; 122:43-53.

Harris, D. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 429-444.

Huang, F.; Macpherson, G. Dendritic cells and oral transmission of prion diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:901-913.

Hur, K.; Kim, J.; Choi, S.; Choid, E.; Carp, R.; Kim, Y. The pathogenic mechanisms of prion diseases. *Mec Age Develop* 2002; 123:1637-1647.

Lasmezas, C. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech Int Epiz* 2003; 22: 23-36.

Lezmi S, Martin S, Simon S, Comoy E, Bencsik A, Deslys JP, Grassi J, Jeffrey M, Baron T. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of Western blotting and immunohistochemical methods. *J Virol* 2004; 78:3654-3662

Liberski, P.; Jaskólski, M. Prion Diseases: a dual view of the prion hypothesis as seen from a distance. *Acta Neurobiol Exp* 2002; 62:197-226.

Llewelyn, C.; Hewitt, P.; Knight, R.; Amar, K.; Cousens, S.; Mackenzie, J.; Will, R. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; 363:417-421.

Monleon, E.; Monzon, M.; Hortells, P.; Vargas, A.; Acin, C.; Badiola, J. Detection of PrP^{Sc} on lymphoid tissues from naturally affected scrapie animals: comparison of three visualization systems. *J Histochem Cytochem* 2004; 52:145-151.

Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.). Scrapie. In: *Manual of Standards Diagnostics Test and Vaccines*. 2000a; 4^a edition. O.I.E. París, Francia. 957 pp.

Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.). Bovine Spongiform Encephalopathy. In: *Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines*. 2000b; 4^a edition. O.I.E. París, Francia. 957 pp.

Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.). Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) worldwide. 2004; <<http://www.oie.int>>. [Consulta: 28-02-2004].

Prince, M.; Bailey, J.; Barrowman, P.; Bishop, K.; Campbell, G.; Wood, J. Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci Tech Off Int Epiz* 2003; 22:37-60.

Prusiner, S. Molecular Biology of Prion Diseases. *Science* 1991; 252:1515-1522.

Prusiner, S. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13363-13383.

Prusiner, S.; Scott, M.; Dearmond, S.; Cohen, F. Prion Protein Biology. *Cell Press* 1998; 93:337-348.

Ryder, S.; Wells, G.; Bradshaw, J.; Pearson, G. Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 2001; 148:437-441.

Torres, J.M.; Brun, A.; Castilla, J.; Sanchez-Vizcaíno, J.M. Enfermedades producidas por priones. <http://www.sanidadanimal.info/priones/priones.htm> 2001 [Consulta: 10-04-2003].

Weissman, C.; Enari, M.; Klohn, P.; Rossi, D.; Flechsig, E. Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16378-16383.



Wilesmith, J. Bovine spongiform encephalopathy and related diseases: An epidemiological overview. N Z Vet J 1994; 42: 1-8.

Will, R. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. Acta Neurobiol Exp 2002; 62:167-173.

Willeroider, M. Routine test reveal unknown strains of BSE prions. Nature 2003; 425:648.

Williams, E.; Miller, M. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2003; 22: 145-156.

Wyatt, M.; Pearson, G.; Smerdon, T.; Gruffydd, T.; Wells, G. Spongiform encephalopathies in a cat. Vet Rec 1990; 126: 513-514.