



ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES ETIOLOGIA Y DIAGNOSTICO



LAURA WEBER*

La **Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)**, pertenece a un grupo de enfermedades que son las **Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET)**, que tienen ciertas características que las hacen temibles a pesar de ser enfermedades raras:

- ✓ Un muy largo tiempo de incubación
- ✓ No existe método de diagnóstico preclínico
- ✓ No existe método de prevención
- ✓ Signos clínicos neurológicos
- ✓ No existe tratamiento, no hay cura, el desenlace siempre es fatal

- ✓ El diagnóstico definitivo sólo se obtiene en el "post mortem"

Tienen en común la proteína del prión de la cual ya han oído hablar (PrP).

Hay dos Encefalopatías Espongiformes Transmisibles animales, que derivan de la Encefalopatía Espongiforme Bovina: la de los "ungulados exóticos" (EUE) que se ha manifestado en animales de zoológico y la "felina" (FSE), que se

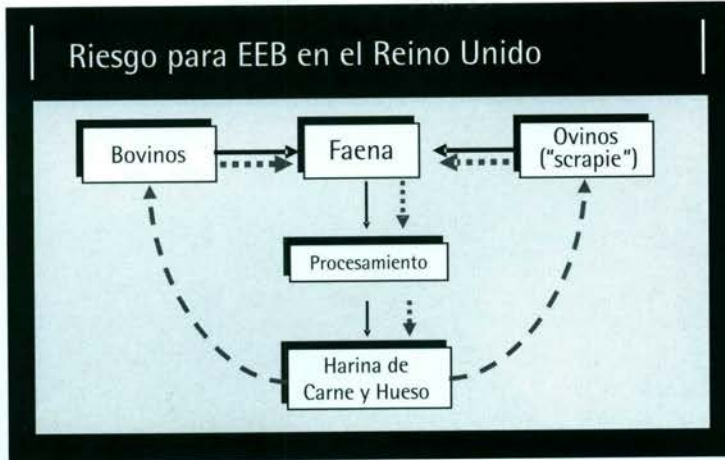


FIGURA 1.

ha manifestado en grandes felinos de zoológicos y en gatos domésticos.

Pero la que más nos interesa en realidad, es la que se detecta en el hombre (vCJD), que se descubrió en el año '96.

El origen de la **EEB** en el Reino Unido, fue la harina de carne y hueso contaminada (con un agente similar al del "scrapie" que es la **Encefalopatía Espongiforme Ovin**a) que fue consumida por bovinos y por ovinos. Estos bovinos infectados fueron a faena y así se produjo el reciclado y volvieron de alguna manera a formar parte de la harina de carne y hueso (**Figura 1**). Esta es la etapa más importante y la causa más importante de la dimensión de la epidemia en el Reino Unido.

En el **Gráfico 1** observamos que, en el año '88 cuando se llegó a la conclusión que el origen de la enfermedad era la alimentación del ganado, se prohibió el uso de harina de carne y hueso en el Reino Unido, cinco años después (correspondiente al tiempo promedio de incubación de la enfermedad), empezó a disminuir el número de casos, eso está actualizado a febrero de este año. Además están señalados los hitos en la historia de la enfermedad.

A principios del '96 se describió por primera vez la aparición de 10 casos de esta enfermedad en humanos. Una enfermedad que por sus características era diferente a las Encefalopatías Es-

pongiformes Humanas esporádicas (vCJD) que se conocían. Unos meses después, se descubrió que bioquímicamente el agente de esta enfermedad del humano era igual al agente de la Encefalopatía Espongiforme Bovina y de las Encefalopatías Espongiformes Felina y la de los Ungula-

A PRINCIPIOS DEL '96 SE DESCRIBIO POR PRIMERA VEZ LA APARICION DE 10 CASOS EN HUMANOS.

dos Exóticos. Pero todavía era un hallazgo bioquímico y aproximadamente un año después se obtuvo la primera evidencia biológica, por inoculación en ratones susceptibles, de que realmente ese agente que infectaba a esos humanos con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) era el mismo indistinguible del agente de Encefalopatía Espongiforme Bovina. Desde entonces ha habido muchas evidencias experimentales que indican que efectivamente esto pasó en humanos.

Confirmed cases of BSE plotted by month and year of Clinical Onset

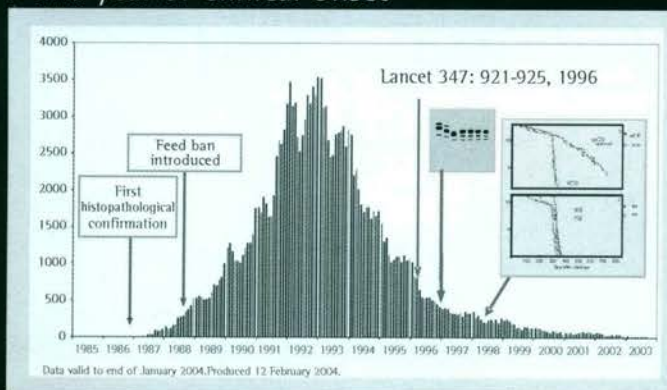


GRAFICO 1.

Con respecto a la naturaleza de agente, es similar al del "scrapie" que se describió alrededor de 1730; bien conocido en Europa, no había evidencias de que hubiera pasado al humano. Se la consideraba una enfermedad genética, hasta se describió el gen que regulaba el tiempo de incubación.

pló: el tamaño pequeño, su gran resistencia. Se indicaban por ejemplo: resistencia a nucleasas que no tenían ácido nucleico y esto los diferenciaba de los virus, además había presencia de proteínas (no existe un diagnóstico preclínico, no hay un diagnóstico en vivo, no hay presencia de anticuerpos contra esta proteína), eso también lo diferencia de los virus.

Hubo muchos años de discusión: virus no convencionales, virus lentos, agentes no convencionales y mucha evidencia experimental que señalaba que esto podía ser una proteína (cosa que todavía se está dudando si es solamente una proteína, pero sí se sabe que siempre está asociada).

LA HIPOTESIS DEL PRION

En 1982 Prusiner definió al agente de "scrapie" y otras EET como "partículas pequeñas proteínicas que resisten la inactivación por procedimientos que modifican ácidos nucleicos" y acuñó el término "prión" (PrP). Las investigaciones posteriores mostraron que existen dos isoformas de PrP, la "normal" o celular, PrP^C, sensible a la acción de detergentes y proteasas, y la asociada a las EET, PrP^{Sc}, resistente. La hipótesis propone que PrP^C, espontáneamente o por

En el año 1936 se produjo la primer transmisión experimental, entonces se empezó a hablar de un agente infeccioso; cuando tenemos un agente infeccioso estamos hablando de algo que se multiplica. Fue así que se empezaron a estudiar las características del mismo, algunas características corresponden con las de virus, por ejem-

EN 1982 PRUSINER DEFINIO EL AGENTE "SCRAPIE" Y OTRAS EET Y ACUÑO EL TERMINO PRION.

contacto con una PrP^{Sc} externa, cambia su conformación, adquiriendo resistencia a los procesos degradativos normales de la célula, por lo que se acumula.

La intervención de PrP^C se demostró por la resistencia de ratones “knock out” para el gen Prnp a la inoculación de PrP^{Sc}, y por la presencia de lesiones características de EET en injertos de cerebro de ratón normal en ratones “knock out” desafiados con PrP^{Sc}. En 1997 Prusiner recibió el Premio Nobel de Medicina por sus hallazgos.

LA PROTEÍNA PRP

PrP^C es una sialoglicoproteína de alrededor de 250 aminoácidos, altamente conservada en las distintas especies. PrP^{Sc} tiene mayor contenido de estructura de hoja b-plegada que PrP^C, lo que le confiere propiedades de amiloide. Presenta inserciones de octapéptidos glicina-prolina, cuya cantidad varía y está aumentada en algunos casos de EET humana hereditaria. Existen en PrP^C varios sitios polimórficos relacionados con la susceptibilidad a alguna EET.

Ciertos residuos en las posiciones 136, 154 y 171 en la PrP del ovino, son un factor de riesgo para “scrapie”. No se encontró hasta el momento relación entre la secuencia de PrP^C bovina y la EEB, pero el bovino es homocigota para metioni-

na en 129, como lo son todos los casos de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob del humano, derivada de EEB.

Los planes actuales de erradicación de “scrapie” en Europa y en Estados Unidos de Norteamérica se basan en la eliminación de los reproductores que presenten glutamina en la posición 171, ya sea en forma homocigota como heterocigota. Esto es fácil de establecer simplemente con una secuencia de ADN, como se hace para los análisis de paternidad.

Recordemos que se creía primeramente que esto era una enfermedad puramente genética, después se paso a que era infecciosa y ahora decimos que es **genética con un componente infeccioso o infecciosa con un componente genético**.

En los países que hay “scrapie” el 95 % de los casos corresponde a animales que son homocigotas para glutamina en esa posición (hablo del 95% de los casos naturales de “scrapie”) esto es importante comercialmente y va a ser cada vez más importante.

Técnicas de diagnóstico: el diagnóstico definitivo como dije sólo se puede hacer en el post mortem, pero hay un test que se hace en vivo (Test del Tercer Párpado) para establecer o determinar el “scrapie” en ovinos, que se basa en ana-

CUADRO 1.

Actividades del CNR	
INSTITUTO DE PATOBIOLOGÍA	
Histopatología	
Inmunohistoquímica	
	• Obex
	• Tercer párpado (ovinos)
INSTITUTO DE VIROLOGÍA	
Detección de PrP	
	• Western blot
	• Tests rápidos
Estudio de genotipos de PrP	
	• Secuenciación
	• RFLP

lizar el tejido linfóide del tercer párpado por inmunohistoquímica y detectar la presencia de la proteína del príon (PrP).

Para el bovino y para la mayoría de las Encefalopatías Espongiformes Humanas se usa el análisis de post mortem (en material de autopsia).

La Organización Mundial de la Salud en el caso de humanos, no acepta que se haga la biopsia, no lo recomienda porque eso representa tomar un trozo de cerebro, sólo permite biopsia en el caso de que exista la posibilidad de que sea otra enfermedad.

Las técnicas de referencia para el caso de Encefalopatía Espongiformes Bovina son:

✓ La **histopatología**, que consiste en la observación de la lesión espongiforme caracte-

la proteína, menos la proteína del príon anormal (si es que está presente) y se observan estas fibrillas por microscopía electrónica; es un diagnóstico complicado y no todos los laboratorios pueden hacer microscopía electrónica.

*Otro método es el **Western Blot***: consiste en la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto proteico obtenido por tratamiento con detergentes y proteasas de material de SNC, seguido de electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa y reacción inmunológica con un anticuerpo específico, detectada por un segundo anticuerpo conjugado con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina) y un sustrato colorimétrico adecuado. Además de la observación de la señal positiva se observa el tamaño de la proteína detectada.

✓ Los **test rápidos**: son test que se han empezado a implementar a fines de los '90 en Europa, porque ellos cuando la enfermedad se diseminó necesitaron analizar gran cantidad de muestras en poco tiempo. En este momento analizan todas las muestras que van a consumo mayores de 30 ó 24 meses, según el país, entonces tienen que analizarlas rápidamente. Analizan muestras de cerebro de oveja, mientras la carcasa del animal está esperando el resultado antes de ser mandada al mercado, en caso de que sea negativa.

En este momento hay cinco test aprobados por la Unión Europea, no es fácil que los aprueben hay todo un procedimiento.

¿QUE HACEMOS NOSOTROS EN ARGENTINA?

En el centro de referencia para el diagnóstico de las Encefalopatías animales, que está en Castellar, que es el Centro de Investigaciones de Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVA) del INTA, existen dos laboratorios: el Instituto de Patobiología y el Instituto de Virología, realizamos los estudios diagnósticos de la vigilancia en el país, por histopatología y por inmunohistoquímica (**Cuadro 1**).

En el Instituto de Virología hacemos la detección de la proteína del príon (PrP) y aplicamos el "Western Blot" y algunos de los test rápidos (los

rística, se ve el corte histopatológico con vacuolas (no cualquier vacuola, tiene que estar en determinados sitios y con una posición de simetría).

✓ La **inmunohistoquímica**, en la que se ven depósitos de la proteína del príon en el cerebro.

✓ **Métodos de observación**, basados en la detección de la proteína del príon (PrP), uno de ellos es:

La observación del SAF(Scrapie Associated Fibrils) "fibrillas asociadas al scrapie" que se observan por microscopía electrónica, éstas se observaron por primera vez aproximadamente un año después que se definiera el príon. El problema es que se requiere tomar material supuestamente infectado, desagregarlo con proteasas y los detergentes destruyen absolutamente toda

EN ARGENTINA TENEMOS
MUY POCO DEL GENOTIPO
MAS SUSCEPTIBLE.



FIGURA 2.

test son muy caros para implementarlos, pero nos han donado test y equipamiento).

También estudiamos lo que llaman genotipos de la proteína del prión, consiste en analizar el ADN de los ovinos del país, para ver si tienen esos aminoácidos fundamentalmente: el ácido de glutamina en la posición 171 que les da susceptibilidad.

Para llevar a cabo esto, nosotros nos hemos capacitado en el centro de referencia que está en Inglaterra, en el centro perteneciente al Departamento de Agricultura de EE.UU. en Aims y además hemos sido entrenados para usar cuatro de los cinco test que están disponibles en el mercado (en el exterior no en la Argentina).

En resumen con respecto a los genotipos, tenemos genotipos susceptibles, esta situación es equivalente a la de Australia y Nueva Zelanda que no tienen la enfermedad, pero sí tienen los

genotipos susceptibles. En Argentina tenemos muy poco del genotipo más susceptible aproximadamente un 3%, esto es en realidad una ventaja (tener los genotipos susceptibles) porque estos son los animales que nosotros decimos que nos sirven como "centinela" para la detección de "scrapie", ya que hasta el momento no ha sido detectada en el país.

En la **Figura 2** se observa una línea de tiempo que cuenta lo que hemos estado haciendo en el laboratorio desde el año '90-'92, simplemente mostramos cómo hemos ido evolucionando en la metodología (en la cantidad de muestras) de acuerdo a cómo iban evolucionando los estándares internacionales y las disposiciones de lo OIE (Organización Mundial de Salud Animal), en esto interviene la Secretaría de Agricultura a través del INTA y el SENASA y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA); en los orígenes del programa participó la industria privada y la Facultad de Ciencias Veterinarias.

***ELBA LAURA WEBER**

Licenciada en Ciencias Químicas (UBA). Doctora en Ciencias Químicas (UBA). Investigador Adjunto, CONICET. Miembro de diversas Sociedades Científicas nacionales e internacionales. Miembro de la Comisión Asesora de Cuarentena y Prevención, SENASA, del Comité Técnico Asesor en Encefalopatías Espongiformes Transmisibles de la SAGPyA de la Nación; del Grupo Técnico de trabajo sobre Encefalopatías Espongiformes Transmisibles de la Representación Regional de la OIE. Autora de numerosas publicaciones en el país y en el exterior. Contacto: lweber@civ.inta.gov.ar