

[ PATOLOGÍA ]

# ¿Es posible diagnosticar Encefalopatías Espongiformes *in vivo*?

**Ana M. Soto Carrión**

**Esperanza Gómez-Lucía**

Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Hasta la fecha, el diagnóstico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), tales como la Enfermedad de las “vacas locas” (EEB) o el Scrapie o tembladera ovina, se realiza *post mortem*, y las medidas de control pasan por sacrificar a todos los animales que posiblemente puedan estar infectados. Se hace obvia la necesidad de disponer de métodos que permitan diagnosticar el proceso *ante mortem*, y eliminar tan sólo aquellos animales verdaderamente infectados. Las autoras describen en este artículo algunas de las técnicas propuestas.



Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles son un grupo de enfermedades que causan degeneración progresiva en el Sistema Nervioso Central (SNC) y cuyo agente etiológico es la proteína prion (PrP), que altera la estructura terciaria de unas proteínas celulares similares (PrP<sup>c</sup>) presentes en al menos los vertebrados superiores, lesionando así el SNC y produciendo encefalopatía. El cambio en la estructura conlleva también un cambio en la sensibilidad a la enzima proteinasa K, por lo que la proteína PrP<sup>c</sup> también se la denomina PrP<sup>sen</sup>, por ser sensible a esta enzima, y la isoforma patógena PrP<sup>res</sup> o resistente. Esta modificación en la sensibilidad se aprovecha para el diagnóstico.

Tres EET destacan por su importancia en Salud Pública: la Enfermedad de las “vacas locas” o Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) ha tenido gran repercusión mediática dentro de las EETs y está sometida a muchas medidas legislativas. Por otro lado, el Scrapie o prurito lumbar enzoótico: afecta a pequeños rumiantes; algunos

## Diagnóstico de las EET

Hasta la fecha, el único diagnóstico que se realiza para determinar la presencia de la proteína prion patógena es *post mortem*. Las muestras que se analizan proceden del óbex cerebral u otros tejidos nerviosos, donde PrP<sup>res</sup> alcanza elevadas concentraciones.

La detección se realiza mediante técnicas inmunocitoquímicas o histopatológicas, o, más frecuentemente, mediante métodos serológicos, aprovechando la resistencia de la PrP patógena a la proteinasa K.

Al digerir el tejido con esta enzima, se elimina la PrP<sup>sen</sup>; la PrP<sup>res</sup> se detecta por anticuerpos anti-PrP.

estudios consideran que es el origen de las EEBs (Marsh, 1993). Y finalmente, la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ): afecta a los seres humanos. Se ha demostrado que una forma de ECJ, denominada “nueva variante” (nvECJ), se origina por la ingestión de alimentos conteniendo PrP de las vacas locas (PrPBSE).

## ¿Es posible el diagnóstico ante mortem?

El control de estas enfermedades se beneficiaría mucho si se pudieran diagnosticar *ante mortem*, detectando aquellos animales en los que la enfermedad sea todavía asintomática y sin necesidad de ser sacrificados. El

La detección de la proteína-prión PrP<sup>res</sup> en muestras de biopsia de tejidos linfoides es considerada como la prueba más fiable para diagnosticar EETs en individuos vivos

desarrollo de métodos *ante mortem* (precozes) está también muy demandado en Medicina Humana, ya que permitiría analizar la sangre de donantes, puesto que se han dado varios casos de transmisión de ECJ por transfusiones (Hunter y col., 2002).

Los métodos precozes tienen como objetivo detectar la proteína príon patógena en las localizaciones extraneurónicas susceptibles de presentarla. Tras su ingestión por vía oral y tras localizarse temporalmente en las tonsilas, los priones van a estar en sangre durante un tiempo (y por eso se pueden transmitir por transfusiones).

Posteriormente se diseminan a diversos tejidos linfoides, tales como el bazo, las placas de Peyer o la membrana nictitante o tercer párpado, donde se puede producir cierta amplificación que se vierte de nuevo a sangre (Saá y col., 2006b). Finalmente alcanzan el cerebro, donde hay gran cantidad de PrP celular, a la que subvierten lentamente, hasta que las le-

## Valor diagnóstico de los tejidos linfoides accesibles

La detección de PrP<sup>res</sup> en muestras de biopsia de tejidos linfoides es considerada por varios investigadores como la prueba más fiable para diagnosticar EETs en individuos vivos. Son varios los científicos que proponen el análisis de las siguientes regiones por su accesibilidad para el diagnóstico de los priones:

- **Membrana nictitante:** La membrana nictitante o tercer párpado es un párpado accesorio que protege el globo ocular, y que puede acumular proteína príon. O'Rourke y col. (2000) compararon en ovejas muestras del tercer párpado (obtenidas tras una simple anestesia local) con las de tonsilas.

Las muestras del tercer párpado de 41 de 42 ovejas con síntomas clínicos y confirmadas de scrapie fueron positivas, mientras que las de 174 de 175 de ovejas sin scrapie fueron negativas. En 36 de 41 (87,8%) ovejas asintomáticas se diagnosticó scrapie en la membrana nictitante y en el cerebro, incluso 20 meses antes de la aparición de los síntomas. Aunque los resultados de esta técnica que permite diagnosticar scrapie *in vivo* en animales asintomáticos son esperanzadores, no han sido constatados por otros autores, y además no gozan de la sensibilidad suficiente.

- **Tonsilas:** La función de las tonsilas o amígdalas es proteger al organismo de la entrada por vía digestiva o respiratoria de agentes extraños. Las amígdalas faríngeas son las de mayor tamaño y se sitúan en la cara interna de las ramas mandibulares en la cavidad bucal. Mathiason y col. (2006) analizaron por inmunohistoquímica las tonsilas de ciervos de una explotación para diagnosticar la enfermedad crónica desgastante (CWD, una EET).

Pudieron diagnosticar el proceso tan pronto como tres meses después de la administración (intracra-neal u oral) de proteína príon extraída de cerebro, cuando los animales permanecían asintomáticos. Si se inoculaban los animales de estudio con muestras con PrP<sup>res</sup> pero no de tejido cerebral, la detección podía demorarse hasta el mes 12 p.i. Además, pudieron constatar que la saliva también tenía priones infectivos, por lo que puede ser un vehículo de la infección.

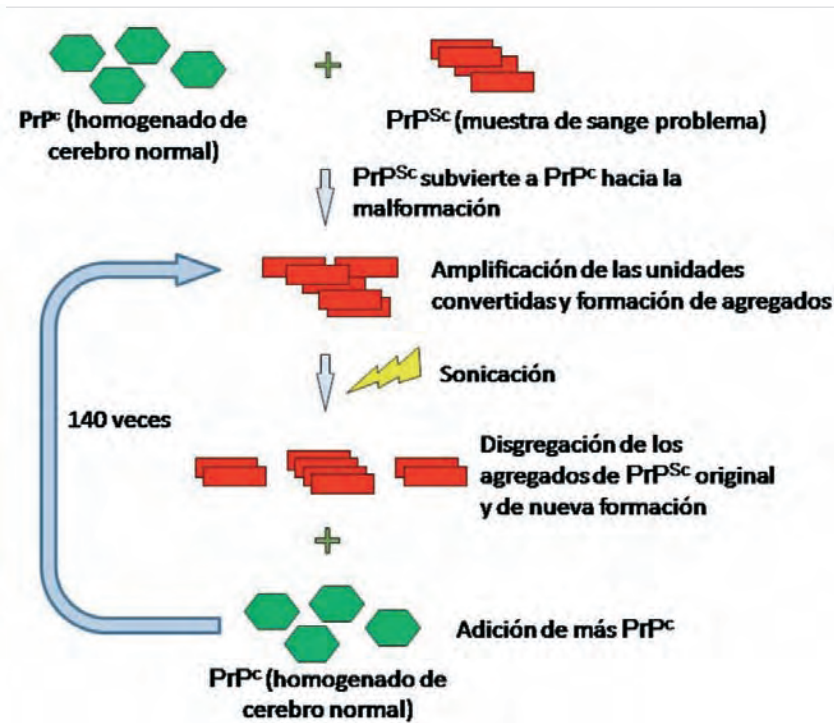
- **Mucosa rectal:** La mucosa rectal es un epitelio estratificado no queratinizado que puede acumular PrP<sup>res</sup>; es fácilmente accesible y su biopsia, de tan sólo 2 cm<sup>2</sup>, no requiere analgesia. El grupo de Espenes y col. (2005) infectaron corderos de dos meses de edad con PrP<sup>Sc</sup> por vía oral utilizando un tubo esofágico. A los 10-24 meses p.i. se les tomó una biopsia rectal sin analgesia y otra de tonsilas.

En cinco animales que no presentaron síntomas no se detectó PrP<sup>Sc</sup> ni en tonsilas ni en recto, y en uno asintomático se detectó en ambos sitios. Sin embargo, hubo un animal que sí que mostró síntomas en los que la biopsia de recto fue negativa. Por tanto, este trabajo no demuestra que la biopsia de recto pueda diagnosticar scrapie en animales asintomáticos o de forma precoz.

Todos estos estudios que detectan proteína príon en tejido linforreticular tienen también el inconveniente de que los autores emplean inmunohistoquímica, tiñendo las biopsias con hematoxilina-eosina, completando la tinción con anticuerpos monoclonales marcados. Estos métodos son tediosos y no están disponibles de forma automatizada para analizar un elevado número de animales.

**Figura 1:**

Esquema del método PMCA, en el que se produce la amplificación de PrP<sup>c</sup> in vitro, por efecto de PrP<sup>Sc</sup>. Los agregados que se forman se disrumen por sonicación antes de añadir más PrP<sup>c</sup> que será a su vez transformada en PrP<sup>Sc</sup>.



siones son tan grandes que se produce la sintomatología. Se eliminan por heces y por orina.

Hasta la fecha no se ha aprobado ninguna técnica para diagnosticar la enfermedad que utilice muestras procedentes de animales vivos. Las razones por las que las pruebas actuales no se consideran apropiadas en seguridad alimentaria es porque no hay suficiente información sobre la dosis infectiva para el desarrollo de las EETs naturales en los animales y el hombre, la distribución tisular de la PrP<sup>res</sup>, y la fase en el periodo de incubación en la que las pruebas diagnósticas actuales pueden detectar la infección natural. Otro inconveniente es la baja concentración, ya que la concentración en sangre es 100 a 1.000 veces inferior que en cerebro (Gavier-Widén y col., 2005).

**[ La sangre, la orina y su valor diagnóstico**

La detección de priones en sangre implica dos problemas. En primer lugar la baja concentración que alcanza en este fluido, y en segundo, el perio-

do en el que se puede encontrar en el mismo. Para superar el primer problema, el grupo liderado por Soto ha ideado un sistema, con un principio similar al de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR que amplifica la cantidad de PrP<sup>res</sup> presente en una muestra (Saborio y col., 2001; Castilla y col., 2006).

El método consiste en combinar la muestra sospechosa con un homogenizado de cerebro normal, donde hay PrP<sup>sen</sup>. La PrP<sup>res</sup> cambia la conformación de la PrP<sup>sen</sup>, transformándola en PrP<sup>res</sup>, que forma agregados. Éstos son disgregados por sonicación, y se añaden a más homogeneizado de cerebro, transformando la PrP<sup>sen</sup> del mismo a su vez, y así sucesivamente durante un número elevado de ciclos (han estimado que el óptimo es 140-144 ciclos) (Figura 1), siendo más sensible si se repite el proceso hasta siete veces con el producto amplificado en cada ronda, diluido 1/10. Han denominado a este método PMCA (*protein-misfolding cyclic amplification*).

La proteína amplificada posee las mismas propiedades bioquímicas,

biológicas y estructurales que la PrP<sup>res</sup> de cerebro, e incluso es infecciosa para animales, produciendo una enfermedad idéntica a la natural (Saá y col., 2006a).

El método ofrece la posibilidad de amplificar la cantidad de PrP<sup>res</sup> en una muestra, haciendo su detección por los métodos serológicos más fáciles. Por lo tanto, la amplificación de priones in vitro combinada con métodos de detección altamente sensibles permitiría el diagnóstico precoz de EETs (Soto y col., 2002). Se ha aplicado para detectar PrP<sup>res</sup> en la sangre de hámsteres, tanto en su periodo sintomático (Castilla y col., 2005), como asintomático (Saá y col., 2006b).

Surgen dos preguntas principales, que hacen que el procedimiento no sea tan esperanzador como cabría esperar: a) los investigadores sólo han realizado PMCA con hámsteres, y aunque mantienen que será extrapolable a otras especies, lo cierto es que hasta el momento no se ha demostrado, y además, parece ser que hay ciertos impedimentos técnicos; y b) en su estudio seriado a lo largo del tiempo, sacrificando hámsteres infectados cada 10 días, han hallado que la presencia de PrP<sup>res</sup> en sangre no es constante (Saá y col., 2006b).

Chang y col. (2007) han propuesto una técnica similar al PMCA, que han denominado Am-A-FACTT, para detectar priones en sangre. La técnica utiliza la estreptavidina como puente



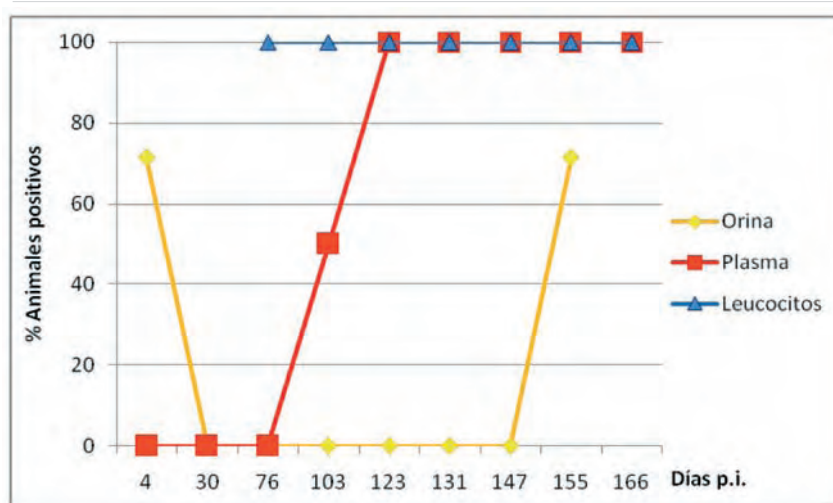
entre moléculas de biotina conjugadas a anticuerpos y unidas a ADN, siguiendo los pasos descritos en la **Figura 2**. Estos investigadores han empleado la técnica para detectar PrP<sup>res</sup> en sangre de ratones (a los que habían inoculado PrP<sup>sc</sup> por vía peritoneal) y de cérvidos (afectados natural y experimentalmente por priones). Sostienen que en las fases tardías aunque asintomáticas del proceso, la técnica tiene una sensibilidad del 100%, mientras que en fases tempranas (día 35 p.i.) es del 50%, manteniendo una especificidad del 100%. En cérvidos parece tener una sensibilidad similar (Chan y col., 2007).

Aunque esta técnica parece muy prometedora porque se ha empleado para detectar la proteína prión en animales silvestres, tiene los mismos inconvenientes que la PMCA, en el sentido de que no se ha aplicado para la detección de las EETs más problemáticas (scrapie, EEB y ECJ) y habría que determinar la capacidad de diagnóstico en distintas fases de la infección.

En la orina de animales y personas con EETs también parece haber una isoforma resistente a las proteasas de la proteína prión. Shaked y col. (2001) proponen detectarla concentrándola por centrifugación y eliminando las sales inhibitorias presentes en el sedimento mediante diálisis, para proceder a eliminar PrP<sup>c</sup> por la digestión con proteinasa K. Detectaron esta

**Figura 2:**

**Presencia de PrP<sup>sc</sup> en distintas muestras de hámsteres inoculados experimentalmente (adaptado de Murayama y col., 2007).**



proteína (UPrP<sup>sc</sup>) mediante WB en muestras de orina concentrada de hámsteres a los 17 días de la infección experimental por vía intracraneal, aunque hasta el día 35 p.i. no volvieron a obtener resultados positivos, no volviendo de nuevo a desaparecer.

Estos investigadores opinan que la técnica tiene una especificidad del 100%, y una alta sensibilidad en animales y personas con síntomas. Murayama y col. (2007) inocularon PrP<sup>sc</sup> a hámsteres por vía oral o por vía intracraneal, aplicando PMCA para la detección. Pudieron detectar UPrP<sup>sc</sup> en la orina a los 4 días p.i. (posiblemente por la sobredosis que se suele administrar a los animales para que se infecten) y en las fases finales de la infección, a partir del día 147 p.i., pero no en los días entre medias (**Figura 2**).

Narang y col. (2005) detectaron PrP<sup>c</sup>, concentrada por un kit comercial con una resina de captura de iones, en la orina de personas sanas. La técnica sería igualmente aplicable a la detección en la orina de PrP<sup>res</sup>, puesto que obtuvieron resultados positivos cuando añadían prión antes de proceder a la concentración. Al igual que Chang y col. (2007) y Mathiason y col. (2006) opinan que el prión debe experimentar cambios en su paso por los riñones, pues no todos los anticuerpos monoclonales reconocen a la molécula en la orina. Además, a diferencia de la proteína prión obtenida por amplificación de priones de san-

gre, UPrP<sup>sc</sup> no induce EET al inocularla en animales de experimentación.

Otra forma de diagnosticar las EETs es indirectamente, a partir de algún compuesto que se asocie a la presencia de priones. Esto es lo que proponen Halimi y col. (2006), quienes han observado que en la orina de las personas con ECJ hay una gran concentración de una isoforma resistente a la proteasa de la cadena ligera de la IgG, que se puede detectar con rojo congo. Parece tener una buena correlación en pacientes sintomáticos. Desgraciadamente, en ECJ es muy difícil considerar la sensibilidad en pacientes asintomáticos, pero este tipo de pruebas se podría hacer en animales, en los que la inoculación experimental es éticamente aceptable. En el mismo sentido, Miele y col. (2001) proponen utilizar un “marcador molecular” de la infección. Sostienen que en las EETs hay una disminución marcada de la expresión del Factor Relacionado con la Diferenciación Eritroide (EDRF). Aplicaron este criterio para diagnosticar scrapie en ovejas con sintomatología.

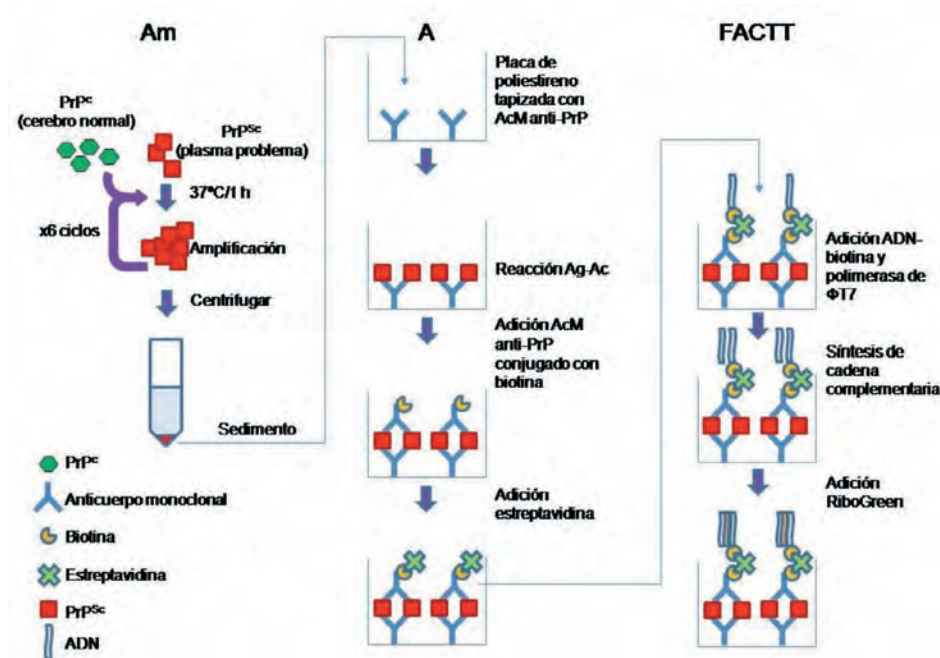
## [ Conclusión

Son muchos los estudios iniciados para diagnosticar las EETs en animales vivos, pero hasta la fecha no existe ningún método no invasivo que permita hacer un diagnóstico certero, en parte porque la información es re-



## Figura 3:

Esquema de la técnica Am-A-FACTT (Chang y col., 2007). Tras amplificar la cantidad de PrP<sup>res</sup> por una técnica similar a PMCA (Am), se centrifuga. En la fase de “ELISA de agregación específica” (A), el sedimento, que es donde se concentra la proteína prión amplificada, se añade a los pocillos de una placa, donde se han fijado anticuerpos monoclonales específicos frente a priones. Se añaden secuencialmente anticuerpos monoclonales marcados con biotina, y estreptavidina, que tiene afinidad por la biotina con la que reacciona. En la última fase (Fluorescent Amplification Catalyzed by T7 RNA polymerase Technique, FACTT) se añade una molécula pequeña de ADN, unida a biotina (para que se combine con el sistema anterior a través de la estreptavidina), que será polimerizada por la polimerasa obtenida del fago T7. Finalmente, se visualiza añadiendo una sustancia fluorescente que se intercala entre las dos hebras de ADN y marca si se ha producido amplificación.



ciente y no ha sido contrastada adecuadamente. La mayoría de las técnicas propuestas no se han puesto en práctica en casos naturales de EEB, Scrapie o nvECJ, y se basan en resultados obtenidos con animales de experimentación (hámsteres).

## Bibliografía

- Castilla J., Saá P., Soto C. (2005) Detection of prions in blood. *Nat Med.* 11:982-985.
- Castilla J., Saá P., Morales R., Abid K., Maundrell K., Soto C. (2006) Protein Misfolding Cyclic Amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods In Enzymology* 412: 3-19.
- Chang B., Cheng X., Yin S., Pan T., Zhang H., Wong P., Kang S.C., Xiao F., Yan H., Li C., Wolfe L.L., Miller M.W., Wisniewski T., Greene M.I., Sy M.S. (2007) Test for detection of disease-as-

sociated prion aggregate in the blood of infected but asymptomatic animals. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:36-43.

- Espenes A., Press C., Landsverk T., Tranulis M.A., Aleksandersen M., Gunnæs G., Benestad S.L., Fuglestad R., Ulvund M.J. (2006) Detection of Prpsc in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J. Comp. Pathol.* 134: 115-125.
- Gavier-Widén D., Stack M., Baron T., Balachandran A., Simmons M. (2005) Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 509-527.
- Halimi M., Dayan-Amouyal Y., Kariv-Inbal Z., Friedman-Levi Y., Mayer-Sonnenfeld T., Gabizon R. (2006) Prion urine comprises a glycosaminoglycan-light chain igg complex that can be satined by Congo Red. *J. Virol. Meth.* 133: 205-210.

7. Hunter N., Foster J., Chong A., McCutcheon S., Parnham D., Eaton S., MacKenzie C., Houston F. (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* 83: 2897-2905.

8. Marsh R.F. (1993) Bovine spongiform encephalopathy: a new disease of cattle? *Arch. Virol. Suppl.* 7: 255-259.

9. Mathiason C., Powers J., Dahmes S., Osborn D., Miller K., Warren R., Mason G., Hays S., Hays-Klug J., Seelig D., Wild M., Wolfe L., Spraker T., Millwe M., Sigurdson C., Telling G., Hoover E. (2006) Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314: 133-166.

10. Miele G., Manson, J., Clinton M. (2001) A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med.* 7:361-364.

11. Murayama Y., Yoshioka M., Okada H., Takata M., Yokoyama T., Mohri S. (2007) Urinary excretion and blood level of prions in scrapie-infected hamsters. *J. Gen. Virol.* 88: 2890-2898.

12. Narang H., Dagdanova A., Xie Z., Yang Q., Chen S. (2005) Sensitive detection of prion protein in human urine. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 230:343-349.

13. O'Rourke J.I., Baszler T.V., Besser T.E., Miller J.M., Cutlip R.C., Wells G.A.H., Ryder S.J., Parish S.M., Hamir A.N., Cockett N.E., Jenny A., Knowles D.P. (2000) Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3254-3259.

14. Saá P., Castilla J., Soto C. (2006a) Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J. Biol. Chem.* 281:35245-35252.

15. Saá P., Castilla J., Soto C. (2006B) Presymptomatic detection of prions in blood. *J. Biol. Chem.* 281: 35245-35252.

16. Saborio G., Permanne B., Soto C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810-813.

17. Shaked G.M., Shaked Y., Kariv-Inbal Z., Halimi M., Avraham I., Gabizon R. (2001) A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected by prion diseases. *J. Biol. Chem.* 276: 31479-31482.

18. Soto C., Saborio G., Anderes L. (2002) Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.* 25:390-394. •