

La Encefalopatía Espongiforme Transmisible Bovina Atípica (BASE). Cristián Begué (MSc;PhD)*; Carlos van Gelderen**. Med. Vet.

- * Instituto de Investigaciones Neurológicas R. Carrea (FLENI). Dpto de Neuropatología. Centro de Referencia para las EETs humanas
- ** Coordinador del Proyecto de Prevención de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles De Los Animales MiniAgri – IICA.

INTRODUCCIÓN

La Encefalopatía Espongiforme Transmisible Bovina¹ (o BSE en inglés) fue descrita en Gran Bretaña en mil novecientos ochenta y seis y pertenece al grupo de enfermedades llamadas Prionopatías o Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSEs en inglés). Otras enfermedades del grupo son: el *Scrapie*² en las ovejas y cabras; la *Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob* en la especie humana³; y el *Creutzfeldt Jakob variante*⁴, una zoonosis producida por la BSE⁵.

Las enfermedades priónicas

Las prionopatías constituyen el único grupo de enfermedades que tiene descritas tres etiologías posibles no excluyentes: formas infecciosas, formas genéticas, y formas idiopáticas⁶.

El *prion*, que es una proteína normal de la sinapsis neuronal cuyo título es especialmente alto en el Sistema Nervioso Central (y su sigla es PrPc), puede adquirir una conformación tridimensional que le confiere patogenicidad (ie. la capacidad de infectar y producir enfermedad). Esta proteína alterada (cuya sigla más común es PrPsc), es considerada el componente crucial del agente infeccioso –aunque no el único^{7,8,9,10}.

El mecanismo para adquirir esta patogenicidad es por contacto (interacción) entre isoformas de la proteína prion sana (PrPc) con isoformas de la proteína prion anómala (PrPsc)^{11,12}, esto implica una vía de infección (ej. oral, intracerebral, otras).

BSE y BASE

Durante dos décadas se asumió que la BSE era producida por una única “cepa priónica”¹³. Pero en 2004, se reportaron en Francia¹⁴ y en Italia¹⁵ dos nuevas cepas atípicas en el ganado bovino. Hasta 2013 se han reportado más de 60 animales con BSE atípica en animales de más de ocho años, en algunos países de Europa (ej: Alemania¹⁶); Canadá¹⁷; EE.UU.¹⁸; Japón¹⁹ y Brasil²⁰.

Si bien entre los científicos existen consensos fuertes (aunque no absolutos) sobre el agente que produce estas enfermedades^{21, 22} también hay discusión y controversia^{23,24,25,26} en la interpretación de algunas observaciones experimentales que a veces no son comparables o compatibles^{27,28,29,30}.

Cepa priónica

Este concepto es distinto al de cepa (cuasiespecie) viral y es complejo ya que se denomina “cepa priónica” al fenotipo (perfil) clínico, neuropatológico y molecular que se produce en un animal infectado experimentalmente con tejido (generalmente cerebro) de otro animal ya enfermo²¹. Esto incluye variables de campos diferentes y técnicas moleculares con puestas a punto delicadas - no siempre fáciles de reproducir o comparar (distintos anticuerpos; animales huésped; inóculos; insumos; etc.).

Los experimentos de caracterización de una cepa generalmente se realizan en dos etapas. En la primera se inoculan animales de laboratorio (ratones transgénicos o no) con una cepa exógena (vacuna; humana; u otra), de este “primer pasaje” generalmente solo una parte de los animales se enferma (*attack rate* bajo) con tiempos de incubación largos. En la segunda etapa se inocula el mismo tipo de ratones con inóculos de cerebros enfermos de los ratones del primer pasaje, este segundo pasaje suele tener un *attack rate* cercano al 100% y uniformidad en los tiempos de incubación que se acortan significativamente. La caracterización en sí de estas cepas se realiza desde tres aproximaciones técnicas³¹.

1. Características bioquímico-moleculares de los priones anormales (PrPsc): es el perfil electroforético, en el Western Blot (WB), de las tres isoformas (bi-; mono- y no glicosiladas) con que se fabrica la proteína prion después de tratarlas con una proteasa. El Western Blot permite caracterizar la cantidad de cada una de las 3 isoformas (*glycoform ratios*) y el peso molecular relativo de cada una de ellas en una foto. Luego es posible comparar estos parámetros entre distintas cepas de infección de partida. Ahora bien, las observaciones entre dos laboratorios están condicionadas a que usen el mismo anticuerpo y el mismo protocolo.

2. Características neuropatológicas: involucra el patrón de deposición en el cerebro (dentro o fuera de las neuronas); formación de agregados (a veces amiloide); patrón de espongirosis y perfil de cuantificación por zonas del cerebro afectadas.

3. Características clínicas del ratón enfermo: tiempo de incubación desde la infección al comienzo de signos clínicos; tiempo entre el comienzo de síntomas y muerte, etc. Otra característica de cada cepa es la dosis necesaria para enfermar a la mitad de los animales inoculados (o LD50%), o en experimentos más limitados directamente la tasa (%) de afectados (*rate attack*).

Similitudes y diferencias entre BSE y BASE

Las primeras descripciones de la BSE-C (de clásica) indicaban que era causada por cepa priónica capaz de atravesar la barrera de especie y mostrar características estables al ser transmitida a otras especies^{13,32, 33,34}. La transmisión accidental a gatos; ungulados exóticos; carnívoros de zoológico y humanos mostró que características moleculares tales como: el tamaño del núcleo (*core*) y su resistencia a proteólisis (un estándar diagnóstico); o el *glycoform ratio* con predominancia de la isoforma de alto peso molecular (ie. la isoforma biglicosilada) se repetían establemente corroborando esta suposición³².

La característica molecular saliente de la encefalopatía espongiiforme bovina “con amiloide”, llamada BASE (*bovine amyloidotic spongiform encephalopathy*), es que sus tres isoformas (post degradación proteolítica y Western Blot) son de menor peso molecular que en la BSE-C, con predominancia de las isoformas del prion mono- y no-glicosiladas¹⁵. A su vez mediante la misma técnica (WB) se distinguieron dos subtipos de BASE que difieren en el peso molecular de la isoforma no-glicosilada: la BASE tipo H¹⁴ (de *high*) que es 1-2 kDa más pesada que su correspondiente en la BSE-C; y la BASE tipo L¹⁵ (de *lite*) que es levemente más liviana.

En cuanto a la deposición neuropatológica, las cepas atípicas identificadas en Italia en animales de 11 y 15 años¹⁵, se diferencian de la BSE-C por la presencia severa de placas de amiloide de PrP; el involucramiento de las cortezas³⁵; del sistema olfativo; del hipocampo y del tálamo; con relativamente poco involucramiento del tallo cerebral^{36,37,38}.

Modelos animales usados en distintos experimentos de infección y caracterización de BASE y BSE-C

Se utilizaron: macacos (primates)³⁹; ratones transgénicos a los que se les ha quitado su gen del prion murino y reemplazado por el gen prion humano (un ratón “humanizado” desde el punto de vista de la proteína prion)⁴⁰; ratones transgénicos similares con el gen del prion bovino⁴¹; y ratones de laboratorio no transgénicos pero bien caracterizados⁴¹; entre otros.

CONCLUSIÓN

De los ejemplos analizados queda claro que la peligrosidad (o inocuidad) de estas llamadas cepas *atípicas* esta lejos de estar resuelta. Son infectivas; son linfotróficas⁴⁰ y dependiendo del modelo de infección (ejs: bovino; primate; ratón transgénico “bovinizado” o “humanizado”) son más o menos virulentas que la BSE clásica, comparten similitudes y diferencias; y la heterogeneidad que suele observarse en otras entidades del grupo neurodegenerativo de las prionopatías.

REFERENCIAS

- 1 Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 1987;121:419–420
- 2 McGowan, J. Scrapie in sheep. *Scottish Journal of agriculture*. 1922;5:365-375
- 3 Araújo, Abelardo. Prionic diseases. *Arq. Neuro-Psiquiatria*. 2013;71(9B):731-7
- 4 Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*. 1996;347:921–925
- 5 Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, et al. Transmissions to mice indicate that ‘new variant’ CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 1997;389:498–501
- 6 Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:13363–13383
- 7 Chesebro B. BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science*. 1998;279:42–43
- 8 Deleault NR, et al. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*. 2003;425:717–720
- 9 Deleault NR, et al. Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem*. 2005;280:26873–26879
- 10 Abid K, et al. Cellular factors implicated in prion replication. *FEBS Lett*. 2010;584:2409–2414
- 11 Ma J, Wang F. Prion disease and the ‘protein-only hypothesis’ *Essays Biochem*. 2014;56:181-91

- 12 A. Aguzzi and A. M. Calella. Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiological Reviews*. 2009;89:1105–1152
- 13 Bruce, ME. Strain Typing Studies of Scrapie and BSE. 1996. En H. Baker, R. M. Ridley, and N. J. Totowa (ed.), *Prion diseases*. Humana Press, Totowa, N.J. pags 223-236
- 14 Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO* 2004;5: 110–114
- 15 Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, et al. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101: 3065–3070
- 16 Buschmann A, Gretzschel A, Biacabe AG, Schiebel K, Corona C, Hoffmann C, Eiden M, Baron T, Casalone C, Groschup MH. Atypical BSE in Germany - proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol*. 2006;117:103–116
- 17 Dudas S, Yang J, Graham C, Czub M, McAllister TA, Coulthart MB, Czub S. Molecular, biochemical and genetic characteristics of BSE in Canada. *PLoS One*. 2010;5:e10638
- 18 Richt JA, Kunkle RA, Alt D, Nicholson EM, Hamir AN, et al. Identification and characterization of two bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in the united states. *J Vet Diagn Invest*. 2007;19:142–154
- 19 Anonym (2012). Report on the monitoring of ruminants for the presence of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) in the EU in 2011. European Union, 2012.
- 20 http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=15148
- 21 Claudio Soto. Prion Hypothesis: The end of the Controversy? *Trends Biochem Sci*. 2011; 36:151–158
- 22 R. Morales, K. Abid, and C. Soto. The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1772:681–691
- 23 Chesebro B. BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science*. 1998;279:42–43
- 24 Abid K, Soto C. The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63:2342–2351
- 25 Telling GC, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*. 1995;83:79–90
- 26 Saborio GP, et al. Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;258:470–475
- 27 Miyazawa K; Emmerling K and Manuelidis L. High CJD infectivity remains after prion protein is destroyed. *J Cell Biochem*. 2011;112:3630–3637
- 28 Manuelidis L. Transmissible encephalopathies: speculations and realities. *Viral Immunol*. 2003;16:123-39
- 29 Manuelidis L, Yu Z-X, Barquero N, Mullins B. Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:1965–1970
- 30 Manuelidis L. A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem*. 2007; 100:897-915
- 31 Lloyd S, Linehan J, Desbruslais M, Joiner S, Buckell J, Brandner S, Wadsworth JDF and Collinge J. Characterization of two distinct prion strains derived from bovine spongiform encephalopathy transmissions to inbred mice. *J Gen Virol* 2004;85:2471-8
- 32 Collinge J., Sidle K. C., Meads J., Ironside J. & Hill A. F. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*. 1996;383:685–690
- 33 Kuczius, T, Groschup, M. H. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med*. 1999;5:406–418
- 34 Kuczius, T, Haist, I, Groschup, MH. Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *J Infect Dis*. 1998;178:693–699
- 35 Priemer G, Balkema-Buschmann A, Hills B, Groschup MH. Biochemical Characteristics and PrPSc Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE. *PLoS One*. 2013;8:e67599
- 36 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;102:112-7.
- 37 Brown P, McShane LM, Zanusso G, Detwile L. On the question of sporadic or atypical bovine spongiform encephalopathy and creutzfeldt-jakob disease. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1816–1821
- 38 Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG, Acutis PL, Polak MP, et al. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in europe. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1821–1829
- 39 Comoy EE, Casalone C, Lescoutra-Etcheagaray N, Zanusso G, Freire S, et al. Atypical BSE (BASE) Transmitted from Asymptomatic Aging Cattle to a Primate. *PLoS ONE*. 2008;3(8):e3017
- 40 Qingzhong Kong, Mengjie Zheng, Cristina Casalone, Liuting Qing, Shenghai Huang, Bikram Chakraborty, Ping Wang, Fusong Chen, Ignazio Cali, Cristiano Corona, Francesca Martucci, Barbara Iulini, Pierluigi Acutis, Lan Wang, Jingjing Liang, Meiling Wang, Xinyi Li, Salvatore Monaco, Gianluigi Zanusso, Wen-Quan Zou, Maria Caramelli, and Pierluigi Gambetti. Evaluation of the Human Transmission Risk of an Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy Prion Strain. *J Virol*. 2008;82:3697–3701
- 41 Rona Wilson, Patricia Hart, Pedro Piccardo, Nora Hunter, Cristina Casalone, Thierry Baron and Rona M. Barron. Bovine PrP expression levels in transgenic mice influence transmission characteristics of atypical bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology*. 2012;93:1132–1140