

El desafío de las enfermedades priónicas, una emergencia en humanos y bovinos

Albeiro López-Herrera*
Anne-Lise Haenni**
Silvio Urcuqui-Inchima*

Abstract

Bovine spongiform encephalopathy (BSE), commonly known as "mad cow disease", is a transmissible disease that struck Europe unexpectedly, and has turned into a disastrous phenomenon. The fear that surrounds BSE stems largely from the fact that it is transmissible to humans, and that at present, our knowledge of how the disease is transmitted and develops remains incompletely understood. The aim of the present article is to present an overall view of the characteristics of this family of diseases, and to comment on recent scientific developments in this area including molecular as well as cellular and clinical aspects, both in humans and in animals.

Key words: PRION, BOVINE AND TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY, CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE, SCRAPIE, KURU.

Resumen

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB), más comúnmente conocida como "enfermedad de las vacas locas", es un malestar transmisible que en forma inesperada y desastrosa ha provocado una crisis severa en la industria cárnica en Europa. La inquietud que propicia la EEB es consecuencia de que la enfermedad es transmisible al hombre y al poco conocimiento que se tiene sobre el mecanismo de transmisión y la patogénesis. Con la presente revisión se pretende presentar una visión general sobre las características de la enfermedad en el bovino y en el humano, así como los avances científicos en este campo, incluyendo aspectos moleculares, celulares y clínicos.

Palabras clave: PRION, ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME TRANSMISIBLE Y BOVINA, ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB, SCRAPIE, KURU.

Introducción

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) constituyen un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales, entre ellas se encuentra la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y otras enfermedades de animales, como el *scrapie*, y del hombre como el *kuru* y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ; Cuadro 1). Tanto el *scrapie*, ya legendario, como el *kuru* más reciente, fueron las primeras enfermedades descritas y sirvieron de modelo para comprender el fenómeno. La EEB y su homólogo humano, la variante de ECJ (vECJ), representan enfermedades emergentes de dimensión internacional, en particular en los países europeos. Las repercusiones futuras de la vECJ sobre la población humana son difíciles de predecir. Desde la aparición de esta última se han escrito muchos artículos y libros, la mayoría de ellos en inglés, sobre las EET.¹⁻¹⁴ A la fecha la EEB no ha sido notificada en animales nacidos en el continente Americano; aunque ha habido casos esporádicos en bovinos importados al continente Americano¹⁵ y no se presente esa enfermedad en América, es importante que la comunidad científica, en particular los Médicos veterinarios, esté informada sobre el peligro que representa esa enfermedad. La presente revisión ofrece una visión global de las características de las EET y de los aportes científicos más recientes al respecto.

Recibido el 12 de febrero de 2002 y aceptado el 4 de junio de 2002.

*Grupo de Inmunovirología -Biogénesis, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D núm. 62-29, Medellín, Colombia.

Correo electrónico: albeirolopez@medicina.udea.edu.co Teléfono (574) 5106059; Fax (574)5106062.

**Institut Jacques Monod, CNRS-Universités Paris 6 et 7, 2 place Jussieu – Tour 43, 75251, París Cedex 05, Francia

La primera enfermedad conocida de este grupo fue el *scrapie*, se presenta en algunas razas de ovejas y cabras; fue descrita hace más de dos siglos, se caracteriza por un periodo prolongado de incubación (de meses a años) y la resistencia del agente etiológico a tratamientos físicos y químicos comunes. El cuadro clínico cursa con ataxia de evolución lenta, temblor y prurito que hace que estos animales se laceren al rascarse contra postes y cercas, y finalmente mueran alrededor de un año después de la iniciación de los signos.¹

En 1936, Cuillé y Chelle lograron transmitir el *scrapie* a corderos sanos mediante la inoculación de cerebro de un cordero enfermo y demostraron la propiedad filtrable del agente.¹⁶ En 1961, el *scrapie* también fue transmitido a ratones,¹⁷ y en 1975 al hámster sirio, que presenta signos clínicos idénticos a los del ratón, pero con un periodo de incubación más corto, alrededor de 18 a 19 semanas.¹⁸ No se tiene conocimiento definitivo sobre el mecanismo de transmisión del *scrapie* en forma natural. Es posible que la transmisión horizontal se realice a través de la placenta, que se ha demostrado contiene el agente, y después del parto ésta queda expuesta en los potreros y otros animales pueden tener contacto con ella o consumirla (placentofagia). En Irlanda se eliminaron rebaños completos de corderos con *scrapie*, y los potreros fueron abandonados. Sin embargo, al repoblar los rebaños con animales sanos, éstos volvieron a presentar el *scrapie* después de tres años, sin que se supiera cuáles fueron las fuentes de transmisión.¹⁹

El *kuru*, por otra parte, representa una enfermedad humana que estuvo confinada a una región al centro de Nueva Guinea, en el pueblo Fore. Los habitantes de ese lugar tenían entre sus costumbres consumir la carne y cerebro de los difuntos (necrofagia). Esta costumbre fue abandonada hace 50 años, desde entonces la enfermedad ha disminuido. No se ha vuelto a informar casos de *kuru* en personas nacidas después de que la práctica fue abolida en los años cincuenta del siglo pasado. Los síntomas son ataxia, temblor que aumenta hasta la parálisis total, afonía y, finalmente, muerte en menos de un año. En especial los niños y las mujeres resultaban víctimas frecuentes de la enfermedad; las mujeres que preparaban las comidas rituales y sus niños se contaminaban con tejidos de cerebro por diferentes vías (conjuntiva, nariz, piel y mucosa gastrointestinal). El periodo de incubación es variable y puede durar más de 30 años antes que aparezcan los primeros signos. Actualmente se presentan menos de diez casos de *kuru* cada año, en comparación con las cifras de más de 200 casos en los años 50.¹

En 1959 se describió por primera vez una similitud entre la neuropatología del *scrapie* y del *kuru*.^{20,21} Esta observación provocó muchas investigaciones sobre la posibilidad de transmitir dicha enfermedad a los animales. En 1965, Gajdusek *et al.* demostraron que chimpancés inoculados intracerebralmente con tejido de cerebro infectado con *kuru*, adquirirían la enfermedad 18 meses después.^{22,23} Los chimpancés presentaron las mismas características patológicas que los humanos. Si la transmisión se hacía directamente desde chimpancé a chimpancé, el periodo de incubación se reducía a diez o doce meses. El *kuru* puede inocularse a monos, cabras y otros animales, y éstos presentan la enfermedad. El suero de animales con *kuru* experimental no contiene anticuerpos específicos contra esta misma enfermedad, ello implica que el mal sería inmunogénicamente inactivo.²²

Con la descripción en 1987 de la EEB, enfermedad que ataca a los bovinos, y en 1996 de una enfermedad relacionada con la EEB en el hombre, la vEJC, un nuevo fenómeno se presentó. Estos descubrimientos propiciaron un interés mundial sobre esas nuevas enfermedades, sobre los agentes etiológicos responsables, su patogénesis y sobre los medios para combatirlas.

La EEB constituye una enfermedad neuropatológica del ganado que cursa con lesiones esponjiformes en el cerebro de los animales afectados; los signos clínicos de la EEB en el ganado afectado se caracterizan por cambios en el temperamento, nerviosismo, agresividad, postura anormal, incoordinación y dificultad para caminar, disminución en la producción de leche, pérdida de la condición corporal a pesar del apetito y después de un periodo de uno hasta seis meses luego que los signos se iniciaron, el animal entra en un periodo de convulsiones y muere.^{24,25}

Características del agente de las EET

El agente causante de las EET probablemente es una proteína generalmente conocida como "prion" o "PrP", codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 20 humano. Constituye una proteína que puede tener más de una forma de repliegamiento y cuya función se desconoce. La forma

replegada correctamente se designa como "PrP^C" (C, por celular). La proteína priónica anormal o patogénica se conoce como "PrP^{SC}" (SC, por *scrapie*). Las dos formas son idénticas desde el punto de vista de sus sitios para enlaces covalentes, sitios de glicosilación y sitio de unión a glicosyl-fosfatidilinositol, pero tienen conformaciones totalmente distintas. Es importante destacar que el aumento de PrP^{SC} en el cerebro de animales afectados no proviene de un aumento de la síntesis de la PrP^{SC} en la célula del huésped, sino que la proteína normal PrP^C sufre una modificación postraduccional, inducida por la proteína patogénica, en el momento del plegamiento y es transformada en PrP^{SC}.⁸

Se han propuesto diversas hipótesis a cerca de cómo se producen las enfermedades priónicas. Una hipótesis temprana proponía la formación de placas priónicas como tumores moleculares, donde la proteína priónica patogénica actuaría como una genotoxina, que directa o indirectamente pero en forma específica, interactúa con su gen celular homólogo, induciendo mutaciones que serían las responsables de un producto proteínico aberrante.²⁶

En la actualidad la hipótesis más aceptada es que la transmisión de las EET es ocasionada por la PrP^{SC} sola, y no implica ningún tipo de ácido nucleico; por tanto, el agente no es un virus. Sin embargo, esta teoría aún no ha sido demostrada definitivamente y la posibilidad de la presencia de un agente semejante a un virus subsiste.²⁷ Se supone que cuando una proteína priónica anormal entra en el cuerpo y llega al cerebro, puede fijarse a una proteína priónica normal y ocasionar la conversión de la proteína normal a la proteína anormal. Igualmente se propuso que un factor, probablemente una proteína de tipo chaperona, llamada "proteína X" aún sin identificar, es importante en la formación de la proteína PrP^{SC}.²⁸ Existen dos modelos posibles para explicar la formación de la proteína PrP^{SC},¹ el de replegado y el de semilla.

En el modelo de replegado (Figura 1A) o modelo asistido por una matriz, el evento empieza por una interacción entre la proteína priónica anormal PrP^{SC} introducida y la proteína priónica normal PrP^C. En este modelo la conversión espontánea de la proteína PrP^C en PrP^{SC} la previene una barrera energética. La unión entre las dos proteínas forma un heterodímero, que provoca la transformación de la proteína normal en anormal, resultando finalmente un homodímero. La ruptura del homodímero conduce a la liberación de los dos elementos, de manera que las proteínas PrP^{SC} se unen cada una otra vez con una proteína endógena PrP^C. Así el ciclo se perpetúa, transformando poco a poco una multitud de proteínas PrP^C en PrP^{SC}. Estas moléculas mal replegadas se unen en homomultímeros en forma de bastoncillos parecidos a placas amiloides.⁵

En el modelo de semilla (Figura 1B) existe un equilibrio termodinámico reversible entre la proteína PrP^C y la proteína PrP^{SC}. Únicamente si varias PrP^{SC} forman una semilla bien ordenada que sirva como semillero infeccioso, proceso muy lento, otras PrP^{SC} pueden reclutarse y, por fin, agregarse en una estructura de tipo amiloide.⁵

Eigen¹⁴ propone un modelo de formación de PrP^{SC} similar al de semilla, en el cual la PrP^{SC} sirve de molde para la transformación de la proteína normal en anormal, pero este proceso sólo se efectúa en los extremos de las cadenas de PrP^{SC}.

Las estructuras amiloides son una característica casi universal de este tipo de enfermedades. A diferencia de la proteína PrP^C, la proteína PrP^{SC} es muy resistente a tratamientos físicos (altas temperaturas, rayos UV) y químicos (desinfectantes comunes, proteinasas, detergentes). Por ejemplo, para destruir una molécula de PrP^{SC} se necesita un tratamiento en seco durante 5 min a temperaturas entre 600°C y 1000°C.²⁹ Esos resultados sugieren que un agente inorgánico que resiste hasta 1000°C pudiera intervenir en la transformación del prion en PrP^{SC}, aunque no se sabe cuál podría ser dicho agente. Además, iones de cobre pueden unirse a dos sitios de la proteína PrP^C, pero no se unen a la proteína PrP^{SC}.³⁰⁻³² Como consecuencia de que el prion se fija a la parte exterior de la membrana, esto hace suponer que sirve para facilitar el paso de iones de cobre desde el medio extracelular al interior de la célula.

Los genes y la secuencia de la proteína PrP^C de muchos animales han sido descritos. El gen humano tiene dos exones,² pero la proteína está codificada únicamente por el segundo exon (Figura 2), que codifica por una preproteína de 254 amino ácidos (aa). Tamaños similares han sido notificados para la proteína PrP de bovinos, ratón y hámster. El gen codifica por una preproteína que presenta tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal un péptido señal.⁵ Durante el proceso de maduración de la

proteína, los dos extremos son eliminados, quedando de un tamaño de 209 aa. La proteína tiene cinco repeticiones de un octapéptido altamente conservado. La variación en el número de octapéptidos conduce a modificaciones en el comportamiento de la proteína. La proteína PrP^C, así como la proteína PrP^{SC} tienen dos posibles sitios de glicosilación, importantes como señales para la distribución correcta del prion en el interior de la célula. También pueden fijar un glicosyl-fosfatidilinositol que permite al prion anclarse a la membrana celular. Las dos proteínas se distinguen en su estructura terciaria; en efecto, la proteína PrP^C está compuesta principalmente de estructuras "hélices-?", mientras la proteína PrP^{SC} se constituye de estructuras "láminas-?".⁴ En la proteína aislada del *scrapie* se encontró una forma de proteína llamada "PrP²⁷⁻³⁰" que corresponde a la parte C-terminal resistente de la proteína PrP^{SC} y su tamaño es de 27-30 kDa. Utilizando anticuerpos contra la proteína PrP²⁷⁻³⁰ se demostró que esa forma está presente en el cerebro de pacientes con enfermedades priónicas, pero no en pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson.^{33,34}

Como no ha sido posible producir cristales de la proteína priónica, la estructura tridimensional de la proteína se ha estudiado principalmente por resonancia magnética nuclear (RMN).³⁵ Utilizando esta técnica se determinó la estructura terciaria PrP^C madura (Figura 2); es decir, desde el aa 23 o 29 en el extremo N-terminal, hasta el aa 230 o 231 del extremo C-terminal de la proteína priónica normal de especies como el ratón, el hámster sirio, el bovino y el hombre.³⁶ La homología de secuencia entre estas proteínas conduce a una estructura similar: Un extremo N-terminal flexible (aa 23-124), un dominio globular central (aa 125-228) y una cadena C-terminal corta (aa 228 a 230 o 231). El dominio globular contiene tres hélices-?, y a cada lado de la segunda hélice se encuentra una lámina-? corta. Según los modelos, y como se vio por otros métodos físicos,³⁷ la transformación de la proteína PrP^C en PrP^{SC} probablemente implica el replegamiento de la región que incluye los aa 90-140, que se transforman en láminas-?. Es esta gran proporción de láminas-? la que conduce a la formación de fibrillas amiloides que se encuentran siempre en PrP^{SC} y en PrP²⁷⁻³⁰.

Con la finalidad de comprender las funciones probables del prion, se produjeron ratones desprovistos del gen del prion; es decir, que no producen la proteína priónica. Estos ratones PrP *knockout* homocigotos Prn-p0/0 parecen normales al igual que sus cerebros. Después de ser inoculados con priones producidos en ratones con *scrapie* no desarrollan los signos de la enfermedad;³⁸ es decir, en ausencia de la proteína PrP^C estos ratones se comportan normalmente, y son totalmente resistentes a la enfermedad. Como las EET no inducen una respuesta inmune en animales normales, ratones Prn-p0/0 fueron utilizados para producir anticuerpos monoclonales, uno de estos anticuerpos fue capaz de precipitar específicamente la proteína PrP^{SC}, y con base en estudios sobre la estructura del prion se definieron tres segmentos de la proteína que interactúan con el anticuerpo.³⁹ Más recientemente se ha descrito que algunos anticuerpos que se fijan al PrP^C en la superficie de la célula, impiden la formación de PrP^{SC} y eliminan la infectividad en cultivos de células.⁴⁰

Una enfermedad nueva en bovinos

En noviembre de 1986 se identificó en el Reino Unido una nueva enfermedad en el ganado bovino, semejante al *scrapie* de las ovejas, que se denominó EEB o "enfermedad de las vacas locas".^{41,42} Para finales de mayo de 1997 existían más de 167 000 casos confirmados en ese país.⁴²

El conocimiento de la fecha en la que comenzó la epidemia de EEB es crucial para interpretar el curso de la enfermedad. El primer caso diagnosticado en 1986, se refería a un animal que murió en 1985,^{24,43,44} y de acuerdo con los modelos de *back-calculation* (cálculo retrospectivo) y *age-period-cohort* (cohorte etárea), algunos autores estiman que ya en 1983 hubo al menos 50 casos,⁴⁵ pero otros investigadores,⁴⁴ aplicando el modelo de "regresión de Poisson", estimaron que los primeros casos ocurrieron en 1980.^{24,44}

Algunos investigadores apoyan la hipótesis de que la EEB existió en animales en una forma no reconocida desde hace mucho tiempo, y que su amplificación fue consecuencia de los cambios en el proceso de fabricación de alimentos para ganadería; ello permitió el paso del agente infeccioso de ganado bovino enfermo a ganado sano y su identificación como enfermedad epidémica.⁴⁴ Sin embargo, se cree que tratándose de un país altamente regulado y de una enfermedad de características clínicas

espectaculares y parecidas a la rabia, contra la que existe un enorme control y vigilancia, no es muy factible que el problema existiera desde antes en forma silenciosa, lo que sí es posible es que el periodo de incubación de los primeros casos haya sido muy prolongado si el origen de la contaminación viniera de una especie diferente.

La evidencia conocida sugiere que la epizootia de EEB en ganado comenzó por el uso de alimentos concentrados que contenían harina de carne y hueso (HCH) producida con el reciclaje de cadáveres de ovejas y partes de cadáveres de ganado bovino, contaminados por un agente semejante a *scrapie* derivado de oveja.^{25,46,47}

Aunque el uso de HCH había sido práctica común durante décadas en el Reino Unido y otros países (desde los años cuarenta del siglo XX), se presume que la aparición del agente infeccioso en los concentrados que serían utilizados para la alimentación del ganado bovino fue causada por los cambios en el proceso de obtención de estas harinas, introducidos por razones económicas a finales de los años setenta y principios de los ochenta del siglo pasado.^{24,25,48} Los cambios incluyeron la remoción del uso de solventes de extracción hidrocarbonados y un incremento en la proporción de HCH en los alimentos animales del 1% al 12%.²⁵ A finales de los años setenta, 65% de las harinas utilizadas en fabricación de alimentos animales tenían origen vegetal y en 1983 sólo 10%, pero 90% era de origen animal.⁴⁴

El efecto de dejar de usar solventes de extracción en la producción de HCH eliminó dos pasos de desinfección parcial para el agente de *scrapie* o de EEB, la prolongada exposición a solventes orgánicos a elevadas temperaturas y la subsecuente remoción de las últimas trazas del solvente por tratamiento de la HCH con vapor a muy alta temperatura. El uso del vapor a altas temperaturas fue remplazado por un método de extracción por calor, que en apariencia permite la supervivencia de agente causal de la EEB.²⁵

La epizootia fue entonces amplificada por reciclaje de subproductos de origen bovino en la alimentación para ganado. La incidencia disminuyó después de que se prohibió el uso de las proteínas derivadas de rumiantes en la producción de alimento para ganados en julio de 1988.⁴²

La epizootia ha involucrado en su mayoría ganado nacido en hatos especializados en la producción de leche, donde es común alimentar las crías con concentrado desde muy temprana edad. Esto último sugiere que una alta proporción del ganado, que ha sufrido EEB, pudo infectarse durante los primeros seis meses de vida. La edad modal de ocurrencia de la enfermedad es de cinco años (rango entre 20 meses y 18 años), y el periodo de incubación fue estimado de 2.5 a ocho años.^{24,25}

Los terneros machos, hijos de vacas lecheras, casi siempre son castrados y sacrificados a los dos años de edad; por esta razón la infección en estos terneros con el agente de la EEB, vía consumo de HCH infectada, normalmente no tendría tiempo de desarrollar enfermedad, y el animal es un portador potencial del agente patógeno.²⁴

Se cree que el promedio de exposición en hatos infectados es tan bajo como 14 DL₅₀ por tonelada de alimento concentrado.²⁴ DL₅₀ es la dosis necesaria para matar a la mitad de la población de un grupo de animales probados.

Cuando se demostró que las EET pueden ser transmitidas vía oral y se entendió este modelo de contaminación, se postuló que la ruta oral era la responsable de la aparición de la epidemia de EEB y probablemente de la vECJ.⁴⁹ Además existen evidencias que muestran que las crías de vacas afectadas con EEB tienen más posibilidad de presentar la enfermedad que las crías de vacas no afectadas.^{50,51} Una posible explicación es la existencia de un bajo nivel de transmisión vertical de la EEB, lo que tendría implicaciones en el comercio internacional de semen bovino, embriones, becerros y bovinos adultos, que al proceder de países afectados pudieran diseminar la EEB a países libres. Sin embargo, en ausencia de conocimiento del mecanismo biológico responsable de la transmisión vertical, es importante considerar otras hipótesis tales como la heredabilidad de la enfermedad, lo que implica la existencia de una susceptibilidad determinada genéticamente.⁴²

Además de la prohibición del uso de proteína animal en la alimentación de rumiantes (en 1988), ese mismo año la enfermedad fue declarada de notificación obligatoria y se inició el sacrificio masivo de animales afectados. Se clasificaron los tejidos bovinos por grado de infectividad (Cuadro 2) y se prohibió

el uso de encéfalo, médula espinal, bazo e intestino en la fabricación de alimentos concentrados, debido a su alto grado de infectividad.⁵²

El número de casos de bovinos con diagnóstico de EEB aumentó drásticamente en el Reino Unido desde 1987. El máximo número de casos se registró entre 1992 y 1993 con al menos mil casos cada semana (Figura 3). Las medidas tomadas no protegieron de contraer EEB a treinta mil cabezas de ganado nacidas después de las prohibiciones, lo que indica que puede haber otra vía de transmisión. Para diciembre de 1996, más de un millón de animales habían sido sacrificados como parte de un gran esfuerzo para eliminar de la cadena alimentaria la totalidad o la mayoría del ganado que hubiera contraído EEB.²⁵ Se estima que la experiencia del Reino Unido con la epizootia de EEB le ha costado a la economía de ese país más de tres mil millones de dólares.⁵³

Se esperaba que para 2001 la epizootia de EEB hubiera desaparecido del Reino Unido, ya que si se acepta que existe transmisión vertical en bajos niveles (mecanismo que no está totalmente entendido), ello no sería suficiente para mantener la epizootia de EEB si la transmisión a través de alimentos contaminados se controla totalmente.²⁵

Barreras de especie

Diez años después que la EEB fuera notificada en el Reino Unido, la vECJ se notificó en ese país. Esta nueva enfermedad se distingue de ECJ clásico en su etiología, epidemiología, perfil clínico y neuropatología. La emergencia de la vECJ hizo pensar que había relación entre el agente causal de la EEB y de la vECJ y que, por tanto, este agente habría saltado la barrera de especie.⁵⁴

Actualmente se acepta que la vECJ es el homólogo humano del agente etiológico de la EEB.²⁵ Existe la hipótesis que esta última es transmitida al hombre por ingestión de tejido muscular; sin embargo, esto es muy improbable ya que nunca se ha encontrado el agente de EEB en músculos de animales naturalmente infectados, incluyendo EEB;²⁴ ello sugiere que el agente causante de la enfermedad se encuentra en otros tejidos (Cuadro 2).

El escenario de la primera exposición humana a EEB en 1980,⁴⁴ predice que los primeros casos de la vECJ comenzaron entre 1983 y 1985. La epidemia de EEB está principalmente localizada en el Reino Unido, y se ha estimado que alrededor de medio millón de animales infectados con EEB entró en la cadena alimentaria humana antes de la prohibición del uso de tejidos bovinos que pudieran contener el agente causal de la EEB y otros trescientos mil animales fueron consumidos entre la prohibición decretada en 1989 y 1995.²⁵ Parece que el consumo de tejidos bovinos contaminados con PrP^{Sc} propició la aparición de la vECJ en los humanos.⁴⁶

Hay evidencia científica que apoya la idea que la EEB ha saltado al hombre causando así la vECJ, enfermedad que preocupa a la población, dada la posibilidad de la transmisión iatrogénica secundaria entre humanos, ya que las propiedades biológicas del agente de EEB adaptado al hombre son poco conocidas. En ese sentido, se ha demostrado que el agente de EEB puede ser transmitido de primate a primate por vía intravenosa y que puede ser reconocido patológicamente si la ruta de transmisión iatrogénica de vECJ fue directamente al sistema nervioso central o en forma periférica. Cepas de EEB replicadas en ratones demuestran que el agente se adapta a macacos de la misma forma como lo haría en humanos, lo cual sugiere que hubo un salto en la barrera de especie y que el agente de EEB es el agente responsable de la vECJ;⁵⁵ además se demostró la similitud molecular de los priones causantes de la vECJ y de la EEB, lo que pone en evidencia que a estas dos enfermedades las causa la misma cepa de prion, diferente de las cepas que producen la forma clásica de ECJ.⁴¹ Por otro lado, no sólo el prion causante de la EEB ha cruzado la barrera de especie, ya que el agente que produce ECJ iatrogénico ligado a la hormona del crecimiento es muy similar al aislado en un caso de *scrapie* de ovejas.⁵⁵

La misma cepa de EEB causante de la enfermedad en bovinos está implicada en la ocurrencia de encefalopatía espongiiforme en gatos domésticos, tigres y algunas especies exóticas de rumiantes en zoológicos.⁵⁶ El agente de la EEB es transmisible por inyección parenteral de cerebro infectado a ovejas, cabras, cerdos, visón, micos tífes y ratones, pero no a hámster o pollos.²⁴ En ovejas y cabras la transmisión oral de EEB es efectiva con 0.5 gramos de cerebro bovino infectado.

El conjunto de estos resultados sugieren que la barrera entre especies para los priones ha sido superada, debido a interacciones ineficientes entre moléculas de PrP en las diferentes especies.

Una enfermedad que causa terror

Las EET, más comúnmente conocidas como enfermedades priónicas, son enfermedades que afectan el sistema nervioso central y causan neurodegeneración progresiva en diferentes animales y en el hombre. Además del *kuru*, la ECJ representa una enfermedad lenta degenerativa del sistema nervioso central, que conduce a una demencia progresiva con degeneración vacuolar de las neuronas, descrita en humanos. Estas enfermedades son transmisibles intra o interespecies por inoculación directa o por exposición al tejido infectado. Muy posiblemente las distintas enfermedades priónicas son causadas por un cambio en la secuencia de aminoácidos en la proteína priónica celular PrP^C. Una homocigosis para el residuo de metionina en la posición 129 ha sido asociada con enfermedades EET.⁵⁷

En 1990, como consecuencia de la emergente epidemia de EEB, el Reino Unido puso en funcionamiento la Unidad de Vigilancia Epidemiológica (UVE) de ECJ con el fin de detectar cualquier posible cambio que surgiera en su epidemiología. En marzo de 1996,⁵⁸ la UVE describió diez casos de enfermos que habían presentado recientemente una forma de ECJ que se diferenciaba de los casos típicos de esta enfermedad y se denominó nueva variante de ECJ; actualmente se prefiere denominarla como vECJ. Esta variante se caracteriza por presentar síntomas iniciales psiquiátricos y por la posterior aparición de un cuadro neurológico. La vECJ es causada por la misma cepa de prion causante de la EEB en vacas.⁵⁹ El curso de la enfermedad tiene un periodo largo (13 meses) y se asocia con el consumo de alimentos contaminados con la EEB. La población general presenta en el gen PrP humano un polimorfismo en el codón 129 que codifica bien por valina o metionina.^{60,61} En todos los casos descritos de vECJ, los individuos son homocigóticos para la metionina, un genotipo que se encuentra aproximadamente en 40% de la población caucásica británica.⁶² Este polimorfismo en el codón 129 se ha asociado con fenocopias de la enfermedad de Huntington, pero no en forma homocigótica sino heterocigótica para la metionina en la posición 129; además presentan una mutación en las repeticiones de octapeptidos presentes en la región amino terminal de la proteína PrP.⁶³

La patogénesis de los dos tipos de enfermedades humanas, ECJ y vECJ, varía sustancialmente según el hospedero y la cepa de prion. Así, por ejemplo, la proteína priónica PrP^{SC} causante de la vECJ se ha descrito en tejido linforreticular, mas no la causante del ECJ.⁶⁴ Hasta el momento no hay evidencia sobre la transmisión de ECJ vía transfusión sanguínea; sin embargo, dada la evidencia que los linfocitos B son cruciales para la neuroinvasión priónica y el alto potencial de prevalencia de casos preclínicos de vECJ, ha conllevado a que el gobierno del Reino Unido y otros Estados tomen precauciones con respecto a la sangre y sus derivados.²⁷ Hasta junio de 2001 en el Reino Unido se habían notificado 101 casos de vECJ (Cuadro 3), de ellos 88 han sido confirmados.⁵⁸

Además de las características clínicas, estos casos de vECJ también difieren de la forma clásica de ECJ en sus características genéticas, neuropatológicas y fenotípicas. Mientras la forma clásica de ECJ aparece generalmente en edades avanzadas, con un pico de incidencia a los 70 años, la vECJ ocurre en personas mucho más jóvenes, con un promedio de edad de 30 años. El curso clínico de la vECJ es más lento que en la forma clásica; en la vECJ el promedio es de 13 meses, mientras que los casos clásicos de ECJ promedian una duración de seis meses. En los casos de vECJ, la actividad eléctrica en el cerebro es diferente a la típica de ECJ esporádico. La histología de la vECJ se caracteriza por la formación de grandes depósitos de proteína priónica en tejido cerebral rodeados de vacuolas (placas floridas) y, a diferencia de la forma clásica esporádica, también se han encontrado depósitos de esta proteína en órganos linfoides periféricos. Antes de describirse la vECJ, se conocían solamente tres formas de ECJ (Cuadro 1): a) Casos esporádicos a través del mundo, de origen desconocido a un promedio de un caso por millón de personas, de los cuales entre 85%-90% resultaban confirmados para ECJ; b) casos familiares (hereditarios) asociados con mutaciones, de los cuales entre 5%-10% correspondían a ECJ; y c) finalmente casos iatrogénicos producto de la transmisión accidental del agente causante a través de instrumental o tejido contaminado. Menos de 5% de los casos de ECJ son de este tercer tipo.⁵⁸

Rápidamente la vECJ se relacionó con la epizootia de EEB que había surgido en el Reino Unido hacía unos diez años. Existen varias razones por las que esta variante se ha relacionado con la EEB, las más importantes son la demostración de la similitud molecular de los priones causantes de la vECJ y de la EEB que pone en evidencia que estas dos enfermedades están causados por la misma cepa de prion, diferente de las cepas que producen la forma clásica de ECJ. Asimismo, experimentos de transmisión en animales de laboratorio han puesto de manifiesto el comportamiento similar de los agentes infecciosos presentes en la vECJ y en la EEB y su diferencia con aquellos propios de otras EET.⁴¹

Según la UVE, todos los pacientes con vECJ informaron haber consumido carne o subproductos de carne bovina en los últimos diez años, pero ninguno dijo haber consumido cerebro; sin embargo, uno de los individuos afectados fue vegetariano, desde 1991. Se concluyó que aunque no había una evidencia científica directa de un eslabón entre la EEB y la vECJ, basado en los datos disponibles y en la ausencia de alguna alternativa clara, la explicación más probable fue que en el momento en que esos casos fueron expuestos a EEB, no se habían introducido las medidas de control, en particular la prohibición específica del consumo de vísceras y cerebro bovino, que se hizo a partir de 1989. Las investigaciones hechas entre 1996 y 2001 dan evidencia suficiente para sugerir una asociación causal entre la vECJ y la EEB.⁴¹

La hipótesis de asociación causal entre la vECJ y la EEB se basa en características patológicas similares a la vECJ descritas en cerebros de monos macacos inoculados con EEB. La distribución del agente infeccioso en el cerebro de ratones infectados de manera artificial con tejido de humanos con vECJ y de vacas con EEB, presentan patrones muy similares. Por último, la evidencia más contundente sobre una etiología idéntica de vECJ y EEB se deriva de un estudio que muestra que las características de la EEB y de la vECJ en ratones, en condiciones experimentales, son similares.⁶⁵

En comparación con el número de casos descritos de EEB, los de vECJ en humanos son mil veces más bajos, pero esta relación está empeorando ya que el total de personas que han contraído la vECJ en el Reino Unido supera los 100; tres casos han sido declarados en Francia y uno en Irlanda.^{58,66,67}

Aunque los síntomas psiquiátricos que manifiestan los pacientes de vECJ son muy heterogéneos, la gran mayoría de ellos presentan en las primeras etapas de la enfermedad, depresión, ideas delirantes y alucinaciones; con el tiempo aparecen síntomas neurológicos, que incluyen ataxia, movimientos involuntarios y alteraciones cognitivas. Los pacientes evolucionan con aumento del déficit neurológico y demencia, los síntomas neurológicos claros suelen aparecer a los seis meses del establecimiento de la enfermedad, y en las fases finales se presenta con frecuencia la aparición de mutismo acinético.

Diagnóstico

Si bien se han hecho muchos progresos en el desarrollo de técnicas que permiten localizar y detectar la presencia de la proteína PrP^{SC}, hasta el momento no existe una prueba para el diagnóstico de vECJ, antes que aparezcan los síntomas clínicos. Sin embargo, con la aparición de nuevas enfermedades de la familia EET que afectan al hombre, muchos investigadores y en especial las empresas farmacéuticas han destinado muchos recursos para el desarrollo o mejoramiento de las técnicas de diagnóstico, que permiten el reconocimiento de las diferentes variantes de la proteína priónica patogénica que afecta al hombre y a los animales. Hacia 1995 el diagnóstico se basaba en técnicas histológicas y bioquímicas como inmunohistoquímica, *western blot* e *histoblot*, cada una de ellas con ventajas y desventajas relativas.⁶⁸⁻⁷⁰

Schulz-Schaeffer *et al.*⁷¹ describieron la técnica *PET blot* (*Paraffin-Embedded Tissue blot*, por sus siglas en inglés) para el diagnóstico de PrP^{SC} en enfermedades priónicas esporádicas y adquiridas, con una mejor sensibilidad que la inmunohistoquímica, el *western blot* o *histoblot*. Con la PET es posible detectar la PrP^{SC} aún en bajos niveles, durante el periodo de incubación, antes de la aparición del cuadro clínico.

Igualmente en los últimos años, la digitalización por RMN, biopsia de amígdala y el examen de fluido cerebroespinal han sido utilizados en el diagnóstico de la enfermedad de la vECJ. Sin embargo, el método más común para la confirmación es el examen histopatológico del cerebro *post mortem*.⁵⁸

Recientemente Wadsworth *et al.*²⁷ lograron precipitar la PrP^{SC} en sodio fosfotúngstico ácido a partir de tejido de cerebro infectado y mediante *western blot* desarrollaron un método muy sensible que se

utiliza para estudiar la localización de la proteína priónica en pacientes con vECJ. Como consecuencia de este método, los investigadores lograron demostrar que la proteína priónica no está distribuida uniformemente en el tejido linforreticular. Actualmente se utiliza ampliamente esta técnica. También se sabe que la PrP^{SC} en pacientes con vECJ se encuentra localizada en otros sitios además del cerebro⁷² (Cuadro 2).

De otra parte, existe evidencia de que la PrP^{SC} sola no produce neuropatología, lo cual sugiere que PrP^{SC} posiblemente debe interactuar con factores celulares para causar daños en el cerebro. En efecto el plasminógeno, proteína implicada en la excitotoxicidad neuronal,^{73,74} es capaz de interactuar con la PrP^{SC} patogénica, pero no con la PrP^C.⁷⁵ Por tanto, el plasminógeno se convierte en el primer factor endógeno descrito, capaz de discriminar entre la proteína normal y la patológica, característica que se ha comenzado a explotar últimamente para el diagnóstico de la enfermedad.

Tratamiento

Los esfuerzos en este tema conciernen principalmente las enfermedades humanas, como la enfermedad ECJ y su variante. Las pruebas se orientan a la búsqueda de productos que pudieran impedir la conversión de la proteína priónica normal en la proteína anormal, y la eliminación de las proteínas mal plegadas. Algunos compuestos probados pueden impedir la propagación del PrP^{SC} en roedores, pero solamente si son coadministrados con el material infeccioso.⁴⁰ Otros como el Rojo Congo impiden la formación de PrP^{SC} en cultivos de células infectadas por el *scrapie*,⁷⁶ pero no tienen efectos si son administrados a roedores al tiempo que aparecen los primeros signos. Otros compuestos se basan en fragmentos de anticuerpos que se fijan al PrP^C sobre la superficie de las células, el tratamiento de células con estos anticuerpos permitió la eliminación del PrP^{SC} ya presente.⁴⁰

Una de las condiciones obligatorias de un principio farmacológico, es que el medicamento pase la barrera hematoencefálica. Esta barrera es un mecanismo de defensa frente a los químicos extraños. Recientemente varios tipos de medicamentos ya conocidos en el tratamiento de enfermedades del cerebro, que se sabe pasan esta barrera, se probaron en el caso de células infectadas con PrP^{SC}; dos de estos medicamentos derivados de la quinacrina y la clorpromazina, utilizados para el tratamiento de la malaria y la esquizofrenia respectivamente, produjeron una respuesta estimulante.⁷⁷ Estas sustancias impiden la formación de la proteína mal plegada, y también parecen eliminar las proteínas que ya están mal plegadas en el cultivo de células. En consecuencia, estos fármacos son candidatos muy prometedores para el tratamiento directo a pacientes con la enfermedad ECJ y otras enfermedades priónicas.

Impacto de la EEB y de la vECJ en el mundo

En 1988, se prohibió el uso de HCH como fuente de alimento para el ganado en el Reino Unido. Sin embargo, el número de casos de EEB aumentó hasta llegar a un pico en 1992 y 1993 (Figura 3). Únicamente en 1992 hubo más de treinta y cinco mil casos en el Reino Unido. El lapso entre la prohibición inicial del uso de HCH y los años durante los cuales el nivel de casos de EEB se incrementó, refleja la duración de la incubación de cuatro o cinco años. Poco a poco, una prohibición mucho más estricta del uso de HCH se aplicó en el Reino Unido. Aunque la situación se mejoró mucho, la desaparición de la enfermedad en los bovinos debió ser más rápida y ya casi total, como lo predicen diversos modelos matemáticos. Hay otros países europeos en los que la incidencia de EEB es relativamente elevada, aunque mucho más baja que en el Reino Unido. En Francia y Portugal, por ejemplo, se notificaron alrededor de 150 casos cada año. Infortunadamente la situación en 2001 no cambió (Cuadro 3).

Las medidas recomendadas por los expertos en el Reino Unido para el uso de HCH y para el consumo de carne bovina, en un principio fueron consideradas excesivas. Este enfoque se sustentaba en la observación de que el *scrapie* del borrego está presente en los rebaños desde hace más de 200 años, y que nunca afectó al hombre.⁴ En consecuencia, el peligro del agente infeccioso no fue reconocido y esas recomendaciones no se aplicaron de manera estricta.

El mercado europeo de carne se afectó severamente con la noticia de que la explicación más probable para los casos de la vECJ en personas menores de 42 años era la ingestión de productos cárnicos

provenientes de bovinos con EEB. Esto no sólo tuvo un impacto sobre los mercados de carne, también afectó las empresas farmacéuticas y de cosméticos relacionadas directa o indirectamente con productos de origen bovino;²⁴ es decir, el impacto global fue impresionante, las pérdidas económicas inmensas y, adicionalmente, un número importante de empleos se puso en peligro, sobre todo en el Reino Unido. Además, subsiste gran inquietud porque no se sabe hasta cuándo continuará aumentando la incidencia de la enfermedad en humanos.

Conclusiones

Debido al conocimiento de que los virus del sarampión y hepatitis C causan enfermedades de lento desarrollo, fue difícil para los investigadores pensar que las EET podrían reproducirse por otro tipo de agente etiológico; es decir, que fueran enfermedades que se propagan sin la participación de un ácido nucleico. Además, estas ideas aún no las aceptan todos los investigadores.

A pesar de lo anterior se ha avanzado mucho en los estudios de las EET y se ha descrito la proteína que causa estas enfermedades. En resumen, se sabe que la proteína PrP^{SC} patógena se distingue de la proteína PrP^C normal por las siguientes características: *a)* Es resistente a tratamientos físicos y químicos; *b)* presenta un alto contenido de estructuras laminas-?; *c)* pierde la capacidad de fijar iones de cobre; *d)* interactúa con el plasminógeno; y *e)* es destruida por compuestos derivados de quinacrina y clorpromazina.

Es importante preguntar: ¿son los mamíferos los únicos organismos que contienen la proteína priónica? La respuesta es *no*, ya que también se ha demostrado que algunas proteínas de levadura, como la proteína Sup35p y Ure2p, con sitios ricos en glutamina y asparagina (Q y N), también son responsables de la transmisión de un fenómeno no mendeliano parecido al de los priones; en ambos casos el fenómeno resulta de una conformación modificada de la proteína normal, originando la forma anormal.^{9,78,79} Además, los agregados de proteínas fibrilares que forman laminas-? y amiloides y se propagan solos, pueden ser medidos por los sitios ricos en Q y N.⁸⁰ El conjunto de esos resultados condujeron a la búsqueda de motivos ricos en Q y N en las proteínas ya descritas implicadas en enfermedades priónicas. Se encontró que esas regiones son más frecuentes en eucariotes que en procariones, y forman un *pool* de proteínas de tipo priónico.⁸¹ Ello significa que en un futuro muy posiblemente se estará en capacidad de predecir o demostrar la presencia de otras proteínas priónicas.

Otra pregunta igualmente importante es: ¿Cuál será la evolución y el futuro de las EET en bovinos y humanos? En primer lugar, en lo que concierne a los bovinos, sorprende que otros países además del Reino Unido no hayan notificado más casos de EEB, ya que después del periodo crítico de 1985, más de cincuenta mil bovinos fueron exportados del Reino Unido a otros países. Algunos casos de EEB han sido descritos en ganado nativo de algunos países de Europa, pero se piensa que la mayoría de ellos contrajeron la enfermedad por el consumo de HCH importada de países afectados. La sorpresa es mucho mayor si se tiene en cuenta que más de setenta mil toneladas de harina fueron exportadas en 1990 desde el Reino Unido hacia otros países europeos para alimento de cerdos y gallinas. Para el caso de bovinos, distintos modelos matemáticos habían previsto que para finales de 2000, la EEB habría casi desaparecido, lo cual es diferente a lo que se conoce actualmente. Ello conduce a pensar que posiblemente hay otras vías que conllevan a un mal plegamiento de la proteína priónica. Recientemente se notificó el primer caso de un bovino infectado con EEB nacido fuera de Europa, este es el caso de una vaca lechera en Japón, a la cual ya se le confirmó el diagnóstico y aún no se conoce cómo se infectó.⁸²

Para el caso de los humanos es muy difícil predecir cuántos casos aparecerán en el futuro, pero con base en lo que se conoce actualmente, algunos modelos predicen un aumento catastrófico de la vECJ hasta ciento treinta y seis mil casos fatales para 2040.⁴⁸ Sin embargo, a pesar de los resultados contradictorios se ha demostrado que se puede consumir tejido muscular de bovino y beber leche sin riesgo.⁸³

No obstante todos los aspectos inquietantes descritos anteriormente sobre las enfermedades EET, no ha sido posible comprender el mecanismo de acción de éstas; sin embargo, existe la aceptación de otros modelos para la transmisión de enfermedades que incluyen mecanismos desconocidos.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al doctor Jorge Ossa Londoño por su apoyo científico y discusiones constructivas; al doctor Manuel Rodríguez por la lectura minuciosa del documento; y al grupo de Inmunovirología de la Universidad de Antioquia, así como a Colciencias por el apoyo financiero. El presente trabajo también fue parcialmente financiado por el CNRS (Francia).

The challenge of prion diseases, an emergency in humans and bovines

Albeiro López-Herrera*
Anne-Lise Haenni**
Silvio Urcuqui-Inchima*

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a group of fatal neurodegenerative diseases, including bovine spongiform encephalopathy (BSE) and other diseases of animals such as scrapie, and of humans such as kuru and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD; Figure 1). The now legendary scrapie, and more recently kuru, were the first TSE diseases described, and served as models to understand the phenomenon. BSE and its human homologue, the variant of CJD (vCJD), represent emerging diseases of global impact, more particularly in European countries. It is, as yet, difficult to predict what repercussions vCJD may have on man. Ever since the appearance of vCJD, a very large number of articles and books have been written on TSEs, most of them in English.¹⁻¹⁴ To date, no cases of BSE have been reported among animals born in America, although sporadic cases have appeared among imported cattle.¹⁵ Even though the disease is not present in the American continent, it appears important to keep the scientific community, in particular the veterinarians of America, informed of the danger that this disease represents. The present review provides a global view of the characteristics of TSE and of the most recent scientific advances in this area of research.

The first known disease of this group was scrapie which appears in certain breeds of sheep and goats; it was described more than two centuries ago, and is characterized by its prolonged incubation period (months or years) and the resistance of the etiological agent to physical and chemical treatments. The clinical course is slow progressive ataxia, tremor and severe pruritus which lead the animals to rub themselves against upright posts, and finally die about a year after the onset of the first clinical signs.¹

It is in 1936 that Cuillé and Chelle first succeeded in transmitting scrapie by inoculating healthy ewes with brain tissue from a sheep with scrapie, and demonstrated that the agent is filterable.¹⁶ In 1961, scrapie was transmitted to mice,¹⁷ and in 1975 to Syrian hamsters that present the same clinical signs as mice but with a shorter incubation time, of 18 to 19 weeks.¹⁸ The transmission mechanism of scrapie in nature is not entirely elucidated. Horizontal transmission probably occurs after birth via the placenta, which is known to contain the agent which remains accessible to the other animals that are in contact with it, or consume it (placentophagia). In Ireland, entire herds of sheep with scrapie were eliminated, and the pastures abandoned. Yet, when after three years, a healthy herd was again introduced in these pastures, the animals acquired the disease, whose source remains unknown.¹⁹

Kuru, on the other hand, is a human disease that was restricted to the Fore people in a region of central New Guinea. The inhabitants of this region practiced ritual necrophagia, which consists in eating the brain and flesh of their dead. This custom was abandoned some 50 years ago, and since then the number of cases of kuru has decreased. No cases of kuru have been reported among persons born after necrophagia was abandoned in the 50's. The symptoms of this disease are ataxia, tremor increasing to total paralysis, aphonia and finally death within less than a year. Children and women were the most frequent victims of the disease, the women who prepared the ritual foods, and their children who were contaminated with brain tissue by various routes, such as conjunctival, nasal, and skin or gastrointestinal mucosa. The incubation period varies considerably and can be as long as 30 years before the first clinical signs appear. To date, fewer than ten cases of kuru are reported per year, as compared to over 200 cases in the 50's.¹

* Grupo de Inmunovirología - Biogénesis, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Carrera 51D núm. 62-29, Medellín, Colombia.

E-mail: albeirolopez@medicina.udea.edu.co Tel: (574) 5106059; Fax: (574) 5106062.

** Institut Jacques Monod, CNRS-Universités Paris 6 et 7, 2 place Jussieu – Tour 43, 75251, Paris Cedex 05, France

A similarity between the neuropathology of scrapie and kuru was first reported in 1959.^{20,21} This observation stimulated research into the possibility of transmitting kuru to animals. In 1965, Gajdusek and his coworkers demonstrated that chimpanzees intracerebrally inoculated with human brain tissue, infected with kuru, became ill 18 months later.^{22,23} These chimpanzees presented the same pathological characteristics as humans. Transmission was also possible directly from chimpanzee to chimpanzee, in which case the incubation period was reduced to 12 months. Kuru can be inoculated to monkeys, goats and to other animals, leading to disease. Serum of animals infected with experimental kuru do not contain specific anti-kuru antibodies, implying that the disease might be immunologically inactive.²²

With the description in 1987 of BSE, a disease attacking cows, and in 1996 of the vCJD related to BSE, it became clear that a new phenomenon had emerged. These observations led to worldwide intense interest in these new diseases, in the causative etiological agents, the ir pathogenesis and in the methods of counteracting them.

BSE, a neuropathological disease of cattle, is accompanied by the appearance of spongiform lesions in the brain of infected animals; it is characterized by changes in temperature, nervousness or aggressiveness, abnormal posture, lack of coordination and difficulties in walking, decreased milk production, loss of fitness in spite of a good appetite, and one to six months after the onset of clinical signs, the animal enters a period of convulsions and dies.^{24,25}

Characteristics of the TSE agent

The causative agent of TSEs is probably a protein normally known as a “prion” or “PrP”, coded in humans by a gene located in the short arm of chromosome 20. Prions can adopt several folding conformations whose functions are unknown. The correctly folded form is designated “PrP^C” (C, for cellular), whereas the abnormally folded or pathogenic form is known as “PrP^{SC}” (SC, for scrapie). The two forms are identical with respect to the sites to which covalent binding can occur, such as glycosylation and glycosyl-phosphatidylinositol binding sites, but possess totally different conformations. It is important to stress that the increase in PrP^{SC} in the brain of afflicted animals is not the result of an increase in the synthesis of PrP^{SC} in the host cell, but that the normal PrP^C protein undergoes a post-translational modification induced by the pathogenic protein at the time of folding, such that it is transformed into PrP^{SC}.⁸

Various hypotheses have been put forward to try to explain how prion diseases are produced. An early hypothesis proposed that the formation of prion plaques which could behave as molecular tumours in which the pathogenic protein would act as a genotoxin that would either directly or indirectly, but specifically, interact with its homologous cellular gene, inducing mutations that would be responsible for the aberrant protein product.²⁶

To date, the most generally accepted hypothesis is that transmission of TSEs is caused by PrP^{SC} alone, without the participation of any nucleic acid; hence, the agent is not a virus. Nevertheless, since this model still has not been unambiguously proven, the possibility of the presence of an agent similar to a virus remains.²⁷ It is believed that when an abnormal prion protein enters the body and reaches the brain, it can bind to a normal prion and lead to the conversion of the normal protein into the abnormal form. It has also been suggested that a factor, such as an as yet unidentified chaperone-like factor, designated “protein X”, is involved in the formation of PrP^{SC}.²⁸ Two possible models exist to account for the formation of the PrP^{SC} protein,¹ the refolding model and the seeding model.

In the refolding or template-assisted model (Figure 1A), the first step is the interaction between an exogenous abnormal PrP^{SC} protein and an endogenous normal PrP^C protein. In this model, spontaneous conversion of PrP^C into PrP^{SC} is prevented by a high-energy barrier. Binding between the two proteins forms a heterodimer that triggers transformation of the normal into the abnormal protein, finally leading to a homodimer. Dissociation of the homodimer leads to the liberation of the two elements, such that each PrP^{SC} protein can again bind to an endogenous PrP^C protein. Thus, the cycle is self-perpetuating, slowly transforming a multitude of PrP^C proteins into PrP^{SC}. These abnormally folded molecules unite to form homomultimeric rods similar to amyloid bodies.⁵

In the seeding model (Figure 1B), a reversible thermodynamic equilibrium exists between the PrP^C and the PrP^{SC} proteins. It is only when several PrP^{SC} form a well-ordered seed that it can serve as

infectious seedling, a very slow process, and that other PrP^{SC} can be recruited to ultimately form an amyloid-type structure.⁵

Eigen¹⁴ has proposed a model for PrP^{SC} formation similar to the seeding model, in which PrP^{SC} serves as mold for the transformation of the normal into the abnormal protein, but this process would only occur at the ends of the PrP^{SC} chains.

Amyloid structures are an almost universal characteristic of this type of disease. As opposed to PrP^C, PrP^{SC} is extremely resistant to physical (high temperatures, UV irradiation) and chemical (common disinfectants, proteinases, detergents) treatments. For example, to destroy a PrP^{SC} molecule, exposure to dry heat for 5 min at temperatures between 600°C and 1000°C is required.²⁹ These results suggest that an inorganic agent resisting 1000°C could be involved in the transformation of the prion into PrP^{SC}, although it is unknown what this agent might be. Furthermore, copper ions can bind to two sites on PrP^C, but do not bind to PrP^{SC}.³⁰⁻³² Since prions bind to the exterior of the membrane, they might facilitate passage of copper ions from the intracellular medium to the exterior of the cell.

The gene and the amino acid (aa) sequence of PrP^C are known for several animals. The human gene contains two exons,² but the protein is encoded by only the second exon (Figure 2), which encodes to a preprotein of 254 aa. Proteins of similar size have been obtained for the bovine, mouse and hamster PrP. The preprotein possesses at its N- as well as at its C-terminal end a signal peptide.⁵ During maturation of the preprotein, these signal peptides are removed, reducing the protein to 209 aa. The protein contains five highly preserved repeated octapeptides. Variation in the number of octapeptides leads to modifications in the behavior of the protein. The PrP^C, as well as the PrP^{SC}, protein contain two possible glycosylation sites that are important signals for correct distribution of the prion within the cell. The protein can likewise bind glycosyl-phosphatidylinositol that allows the prion to attach to the cell membrane. The two proteins, PrP^C and PrP^{SC}, differ in their tertiary structures; whereas PrP^C is composed mostly of α -helices, PrP^{SC} contains principally β -sheets.⁴ The protein isolated from scrapie contains a form known as “PrP²⁷⁻³⁰” that corresponds to the C-terminal resistant part of PrP^{SC}, whose size is 27-30 kDa. Using antibodies raised against PrP,²⁷⁻³⁰ it was shown that this form of the protein is present in brain tissue of patients with prion disease, but not in patients with Alzheimer or Parkinson’s disease, that are also neurodegenerative diseases.^{33,34}

Since it has as yet not been possible to obtain crystals of prions, it is essentially by nuclear magnetic resonance (NMR)³⁵ that the three-dimensional structure of the mature mouse, Syrian hamster, bovine and human PrP^C was established, namely, from the protein at the N-terminal (aa 23 or 29) to the C-terminal residue (aa 230 or 231).³⁶ The great homology that exists between these proteins leads to a similar structure: a flexible N-terminal end (aa 23-124), a central globular domain (aa 125-228) and a short C-terminal chain (aa 228 to 230 or 231). The globular domain contains three α -helices, and on either side of the second helix lies a short β -sheet. According to the models, and as demonstrated by other physical methods,³⁷ the transformation of PrP^C into PrP^{SC} probably implies refolding of the aa 90-140 region into β -sheets. The large proportion of β -sheets would be responsible for the formation of amyloid fibrils always present in PrP^{SC} and in PrP²⁷⁻³⁰.

With the aim of understanding the possible functions of prions, mice devoid of the prion gene and hence devoid of prions were produced. Such knockout homozygous Prn-p0/0 mice appear normal, as does their brain tissue. After inoculation with prions produced in mice afflicted with scrapie, the knockout mice did not develop disease symptoms.³⁸ Thus, in the absence of PrP, these mice develop normally and are totally resistant to the disease. Since TSEs do not induce an immune response in normal animals, Prn-p0/0 mice served to produce monoclonal antibodies; one of these antibodies was capable of specifically precipitating the PrP protein, and based on the prion structure, three segments that interact with the antibody within the protein, were defined.³⁹ More recently, it was shown that certain antibodies that bind to PrP^C on the surface of the cell, prevent the formation of PrP^{SC} and eliminate infectivity in cell cultures.⁴⁰

A new disease in cattle

In November 1986, a new illness appeared in cattle herds in the United Kingdom, that appeared similar to scrapie in sheep and was designated BSE or “mad cow disease”.^{41,42} By the end of May 1997, more than 167 000 cases had been confirmed.⁴²

It is crucial to know the date at which the BSE epidemic began so as to understand the evolution of the disease. The first case diagnosed in 1986 concerned an animal that died in 1985.^{24,43,44} Based on back-calculation and age-period-cohort models, certain authors estimate that by 1983, there were already more than 50 cases of BSE,⁴⁵ while others,⁴⁴ applying the regression model of Poisson, estimate that the first cases occurred in 1980.^{24,44}

Certain investigators⁴⁴ favor the hypothesis whereby BSE has long existed though unidentified, in animals, and suggest that amplification of BSE resulted from changes in the methods used to produce cattle feed; this would have allowed the transfer of the infectious agent from diseased to healthy cattle and its identification as responsible for the epidemic. Nevertheless, it was believed that since this concerned a country with strict regulations and a disease with spectacular clinical characteristics, similar to those of rabies, against which extreme surveillance is maintained, it was unlikely that the disease could have existed for long in a quiescent state. What is more likely, is that the incubation time of the first cases may have been very long if indeed the contaminating agent originated from another species.

The available evidence suggests that the BSE epizootic in cattle began with the use of feed concentrates containing meat-and-bone meal (MBM) produced from recycled tissues from dead sheep and beef contaminated by an agent similar to scrapie derived from sheep.^{25,46,47}

Even though the use of MBM had been common practice for decades in Great Britain and other countries (since the 40's), it is assumed that the appearance of the infectious agent in the concentrates used to feed cattle was probably caused by changes introduced for economic reasons, at the end of the 70's and beginning of the 80's to produce these meals.^{24,25,48} The changes included doing away with the hydrocarbon extraction step and an increase from 1% to 12% in the proportion of MBM in animal feed.²⁵ At the end of the 70's, 65% of the meal used to produce animal feed originated from plants, and in 1983 it was only 10% whereas 90% was of animal origin.⁴⁴

Indeed, omission of the solvent extraction step to produce MBM eliminated two partial disinfection steps of scrapie or BSE, the prolonged exposure to organic solvents at elevated temperatures and the subsequent removal of the last traces of solvent by treating the MBM with pressurized steam. The use of pressurized steam at high temperatures was replaced by a heat extraction step that apparently did not prevent survival of the infectious agent of BSE.²⁵

Consequently, the epizootia was amplified by feeding cattle with recycled bovine offal. It only began to decline after July 1988 when the use of proteins derived from ruminants was forbidden during the production of cattle feed.⁴²

The epizootic occurred essentially among animals born in milk farms, where it is common to feed calves with food concentrates as of a very early age. This suggests that a large proportion of the cattle infected with BSE could have become contaminated during the first six months of their lives. The modal age of the disease is five years (ranging between 20 months and 18 years), and the incubation period was estimated to be between 2.5 and eight years.^{24,25}

Bulls born from milk-producing cows are nearly always castrated and sacrificed at about two years of age; hence, infection of these bulls with the agent of BSE through MBM-infected feed would hardly have had time to develop, but the animals would be potential carriers of the pathogen.²⁴

It has been calculated that the average exposure in infected herds could have been as low as 14 oral DL₅₀ per ton of concentrate,²⁴ one DL₅₀ being the dose required to kill 50% of a group of test animals.

When it was demonstrated that TSEs could be transmitted orally and that such a contamination route was understood, it was postulated that oral contamination was most likely responsible for the upsurge of the BSE and probably also of the vCJD epidemic.⁴⁹ In addition, results show that calves born of cows infected with BSE are more likely to present the disease than calves born from uninfected cows.^{50,51} A possible explanation for this observation is that there exists a low level of vertical transmission of BSE; this would have repercussions on the international trade of semen, embryos, and

young and adult cattle originating from countries harboring the disease, since this could disseminate BSE to countries still free of the disease. However, without precise knowledge of the biological mechanism responsible for vertical transmission, it is important to consider other hypotheses such as a hereditary factor which would imply the existence of genetically determined sensitivity.⁴²

In 1988, in addition to banning the use of animal proteins in cattle feed, it became compulsory to notify all cases of the disease and to kill all the affected animals. Cattle tissues were classified based on their level of infectivity (Table 2), and the use of brain, spinal column, spleen and the small intestine was prohibited for the production of ruminant feed, because of their high level of infectivity.⁵²

The number of case of cattle diagnosed with BSE increased dramatically in the United Kingdom as of 1987. The largest number of cases occurred between 1992 and 1993, with at least 1000 cases per week (Figure 3). The measures taken did not prevent 30 000 animals from being born after prohibition measures took effect, indicating that other transmission routes may exist. By December 1996, more than a million animals had been sacrificed as part of an immense effort to totally eliminate from the chain, most if not all the cattle that had been contaminated by BSE.²⁵ It is estimated that the epizootic experienced by the United Kingdom has cost the country more than \$3 billion dollars.⁵³

It was hoped that by 2001 the BSE epizootic would have disappeared from the United Kingdom, and that even though low levels of vertical transmission might exist (a mechanism as yet poorly understood), this would be insufficient to maintain the epizootic, if transmission through contaminated feed was totally controlled.²⁵

Species barriers

Ten years after BSE had first been reported in Great Britain, vCJD was described in this same country. This new disease is different from classical CJD in its etiology, epidemiology, clinical course and neuropathology. The appearance of vCJD made it seem likely that a connection might exist between the causative agent of BSE and that of vCJD, and that this agent would have crossed the species barrier.⁵⁴

It is presently believed that vCJD is the human homologue of the etiological agent of BSE.²⁵ One hypothesis proposes that BSE is transmitted to humans through the consumption of infected muscle tissue; however, this is highly unlikely since never has an agent of TSEs, including that of BSE, been found in the muscles of naturally infected animals, suggesting that the causative agent is located in other tissues (Table 2).

The scenario in which the first human was exposed to BSE in 1980,⁴⁴ implied that the first cases of vCJD might appear between 1983 and 1985. The BSE epidemic has been essentially centered in the United Kingdom, and it has been estimated that until the use of bovine tissues possibly contaminated with the causal agent of BSE was banned in 1989, about half a million animals infected with BSE entered the animal food chain, and a further 300 000 animals were consumed between 1989 and 1995.²⁵ It seems likely that the consumption of bovine tissues contaminated with PrP^{SC} led to the appearance of vCJD in humans.⁴⁶

There is scientific evidence that it is through contamination by BSE that humans were infected resulting in vCJD, a disease that has raised tremendous concern, because of the possibility of a secondary iatrogenic transmission from human to human and because the biological properties of a potential BSE adapted to humans are poorly defined. From this point of view, it has been demonstrated that the infectious agent of BSE can be transmitted intravenously from primate to primate and that the pathological signs can easily distinguish whether iatrogenic inoculation was into the central nervous system or into peripheral tissues. Strains of BSE replicated in mice demonstrate that the agent has adapted to macaques as it would to humans. Hence, a species barrier was probably overcome, the BSE agent being responsible for vCJD.⁵⁵ Moreover the prions causing vCJD are very similar to those producing BSE, implying that these two diseases are caused by the same prion strain and are different from the strains leading to the classical form of CJD.⁴¹ In addition, not only has the prion responsible for BSE crossed the species barrier, but the agent responsible for classical iatrogenic growth hormone-linked CJD is very similar to scrapie isolated from sheep.⁵⁵

The same strain of BSE responsible for the disease in cattle, is involved in the spongiform encephalopathies occurring in domestic cats, tigers and certain species of exotic ruminants in zoos.⁵⁶ The BSE agent is transmissible by parenteral injection of infected brain tissues to lambs, goats, pigs, bison, mico titis monkeys and mice, but not to hamsters or hens.²⁴ In lambs and goats, 0.5 g of bovine brain infected with BSE is sufficient for transmission.

Taken together, these results suggest that interspecies barriers for prions have been overcome, because of the inefficient interactions between PrP molecules in the different species.

A terrifying disease

TSEs, more commonly known as prion diseases, affect the central nervous system leading to progressive neurodegeneration in various animals and in man. In addition to kuru, CJD is a slow degenerative disease of the human central nervous system resulting in progressive dementia with vacuolar degeneration of neurons. These diseases are transmissible within or between species by direct inoculation or by contact with the infected tissue. It is highly likely that the various prion diseases are caused by a change in the amino acid sequence of the cellular prion PrP^C. Homozygosity at the polymorphic methionine residue in position 129 has been associated with TSE diseases.⁵⁷

In 1990, as a consequence of the emerging BSE epidemic, the United Kingdom put into place a Surveillance Unit for CJD with the aim of detecting whatever change might occur in the epidemiology of the disease. In March 1996,⁵⁸ the Surveillance Unit described ten patients who had recently presented a form of CJD different from the typical form of the disease; it was called the new variant of CJD. The designation vCJD is usually preferred today. This variant is characterized by initial psychiatric symptoms and the later appearance of neurological symptoms. vCJD is caused by the prion strain responsible for BSE in cows.⁵⁹ The course of the disease is slow, about 13 months, and is associated with ingestion of food contaminated with BSE. The general population presents a polymorphism in codon 129 that codes for valine or methionine.^{60,61} In all the cases of vCJD described, individuals are homozygotes for methionine, a genotype found in about 40% of the Caucasian population in Britain.⁶² This polymorphism in codon 129 has been associated with phenocopies of Huntington's disease, not as homozygotes for methionine in position 129, but as heterozygotes. Moreover, these individuals present a mutation in the octapeptide repeats present in the amino terminal part of PrP.⁶³

The pathogenesis of the two types of human disease, CJD and vCJD, varies considerably depending on the host and the prion strain. For example, the prion protein PrP^{Sc} responsible for vCJD has been described in lymphoreticular tissues, but not the PrP^{Sc} responsible for CJD.⁶⁴ To date, there is no indication that CJD is transmitted by blood transfusion. Nevertheless, in view of the evidence that B lymphocytes play a prominent role in prion neuroinvasion and the high prevalence of potential preclinical cases of vCJD, the governments of the United Kingdom and of other countries have taken important precautions with respect to blood and its derivatives.²⁷ Up to June 2001, 101 cases of vCJD had been notified (Table 3), of which 88 have been confirmed.⁵⁸

In addition to their clinical characteristics, the cases of vCJD also differ from the classical form of CJD by their genetic, neuropathological and phenotypic characteristics. Whereas the classical form of CJD usually appears at an advanced age, with a maximum incidence peak at about 70 years, vCJD appears in much younger persons averaging 30 years. The clinical course of vCJD is slower than the classical form; in vCJD the average time is 13 months, whilst for classical CJD it is of six months. In vCJD, the brainwave pattern is different from that of typical sporadic CJD. The histology of vCJD is characterized by the formation of large deposits of prion protein in brain tissue surrounded by vacuoles (florid plaques), and as opposed to the sporadic classical form, deposits of the protein have also been observed in peripheral lymphoid organs. Before the appearance of vCJD, only three forms of CJD disease were known (Table 1): *a*) sporadic cases of unknown origin reported throughout the world, on average one case per million persons of which 85%-90% were confirmed CJD cases; *b*) familial (hereditary) cases associated with mutations, of which 5%-10% correspond to CJD; and *c*) iatrogenic cases produced by accidental transmission of the causative agent through contaminated instruments or tissues. Fewer than 5% of the cases of CJD are of this third type.⁵⁸

vCJD was rapidly linked to the BSE epizootic that had emerged in the United Kingdom some ten years earlier. Several reasons led to the belief that the variant was related to BSE; the most important was the demonstration of the similarity between the molecules of the prions causing vCJD and BSE, implying that both diseases are due to the same prion strain, a strain different from those leading to the classical form of CJD. Likewise, experiments of transmission to laboratory animals have clearly shown that the infectious agents present in vCJD and in BSE behave similarly and are different from those of other TSEs.⁴¹

According to the Surveillance Unit, all the patients with vCJD declared having eaten beef or its sub-products during the preceding ten years, but none declared having eaten brain; however, one of the patients had been a vegetarian since 1991. It was concluded that even though there was no direct scientific evidence for a link between BSE and vCJD, based on the available data and in the absence of any clear alternative possibility, the most likely explanation was that at the time when those individuals were exposed to BSE, the control measures taken in 1989 had not yet been introduced, in particular the specific prohibition of eating bovine intestines and brain. Research conducted between 1996 and 2001 provides sufficiently clear evidence to suggest a causal link between vCJD and BSE.⁴¹

The hypothesis of a link between vCJD and BSE is based on the similarity in the pathological characteristics described in vCJD and in macaques inoculated with BSE. The distribution of the infectious agent in mouse brain artificially infected with human brain homogenates infected with vCJD or cow homogenates infected with BSE, is very similar. Finally, the most convincing evidence that the etiology of vCJD and BSE is the same, comes from a study showing that the characteristics of BSE and vCJD in experimental conditions in mice, are similar.⁶⁵

As compared to the number of cases of BSE described, those of vCJD in humans are a thousand times lower, although the situation is worsening and the total number of individuals infected with vCJD in Great Britain is greater than 100. Three cases have been identified in France, and one in Ireland.^{58,66,67}

Even though the psychiatric symptoms of patients with vCJD are very heterogeneous, the majority of the patients present, during the first steps of the disease, depression, delirious ideas and hallucinations. With time, neurological symptoms appear that include ataxia, involuntary movements and altered cognition. The patients then present neurological deficits and dementia. The neurological symptoms appear clearly six months after the onset of the disease, and in the final phase, mutism through akinesia frequently appears.

Diagnosis

Even if much progress has been made in the development of techniques that make it possible to locate and detect the presence of PrP^{SC}, to date no method exists to diagnose vCJD prior to the onset of the clinical symptoms. Nevertheless, with the appearance of new diseases of the TSE family that affect humans, many scientists and particularly pharmaceutical industries have directed much effort to develop or improve the diagnostic techniques that might make it possible to identify the variants of the pathogenic prion protein that affects humans and animals. Until 1995, diagnosis was based on histological and biochemical, as well as immunohistochemical methods, western blots and histoblots, each with its advantages and disadvantages.⁶⁸⁻⁷⁰

Schulz-Schaeffer *et al.*⁷¹ described the PET blot (Paraffin-Embedded Tissue blot) technique for the diagnosis of sporadic and acquired prion diseases. This method is more reliable than the immunohistochemical methods, and is more sensitive than western blots or histoblots. With PET, it is possible to detect even low levels of PrP^{SC} during the incubation period, before the onset of clinical symptoms.

Similarly, within the last few years, digitalization by NMR, tonsillar biopsy and cerebrospinal fluid tests have been used to diagnose vCJD. Nevertheless, the only confirmation of vCJD is the histopathological examination of the brain *post mortem*.⁵⁸

Recently, Wadsworth *et al.*²⁷ succeeded in precipitating PrP^{SC} in sodium phosphotungstic acid from infected brain tissue, and by means of western blots developed a very sensitive method that is used to study the localization of the prion protein in patients with vCJD. With this method, it was possible to

demonstrate that the prion protein is not uniformly distributed in lymphoreticular tissues; this technique is now commonly used. It is also known that in patients with vCJD, PrP^{SC} is located in other tissues in addition to the brain (Table 2).

On the other hand there is evidence that PrP^{SC} alone does not produce neuropathology, suggesting that PrP^{SC} probably interacts with cell factors to damage the brain. Indeed, plasminogen, a protein implicated in neuronal exitotoxicity,^{73,74} can interact with PrP^{SC} but not with PrP^C.⁷⁵ Thus, plasminogen is the first endogenous factor capable of discriminating the normal from the pathogenic protein, a property that is now being exploited to diagnose the disease.

Therapeutic approaches

Efforts in this area are mainly centered around human diseases such as CJD and its variants. Attempts are directed toward the search of compounds that might prevent the conversion of the normal into the abnormal prion, and the elimination of the misfolded proteins. A few of the compounds tested can prevent propagation of PrP^{SC} in rodents, but only if administered together with the infectious material.⁴⁰ Others, such as Congo Red prevent the formation of PrP^{SC} in scrapie-infected cell cultures,⁷⁶ but are without effect if administered to rodents when the first signs appear. Other components are based on fragments of antibodies that bind to PrP^C on the surface of the cells; treatment with these fragments clears the cells of pre-existing PrP^{SC}.⁴⁰

One of the main conditions of a pharmacological principle, is that the medication cross the blood-brain barrier. This barrier is a defense mechanism against foreign compounds. Recently, various types of compounds already used in the treatment of brain diseases and known to cross the blood-brain barrier were tested for their effect on cells infected with PrP^{SC}; two types yielded encouraging results, derivatives of the quinacrine used against malaria, and derivatives of chlorpromazine, an antipsychotic drug.⁷⁷ In cell cultures, these compounds prevent the formation of the misfolded protein and also appear to eliminate the proteins that are already misfolded. Consequently, these compounds are very promising candidates for the direct treatment of patients with CJD and other prion diseases.

Impact of BSE and vCJD in the world

In 1988, the use of MBM as a source of feed for cattle was banned in the United Kingdom. Nevertheless, the number of cases of BSE increased, reaching a peak in 1992 and 1993 (Figure 3). In 1992 alone, more than 35 000 cases were reported in the United Kingdom. The time that elapsed between initial prohibition of the use of MBM and the years during which the number of BSE cases increased, reflects the incubation time of four or five years. Little by little, much stricter prohibition of the use of MBM was installed in the United Kingdom. Even though the situation improved considerably, the disappearance of the disease in cattle should have been much more rapid and by now virtually total, as predicted by various mathematical models. Other countries also have a rather high incidence of BSE, although numbers are far lower than in the United Kingdom. In France and Portugal, for example, about 150 cases have been reported each year. Unfortunately, the situation did not change in 2001 (Table 3).

The precautions recommended by the specialists of the United Kingdom concerning the use of MBM and the ingestion of beef were at first considered excessive. This was based on the fact that scrapie in lambs had been present in herds for the last 200 years without ever affecting man.⁴ Consequently, the danger caused by the infectious agent was not accepted and the recommendations were not strictly applied.

The European meat market was severely affected by the demonstration that the most likely explanation for the appearance of vCJD in subjects of less than 42 years was the ingestion of meat derived from cattle infected with BSE. This not only affected the meat market, but also the pharmaceutical and cosmetic industries directly or indirectly related with products of bovine origin.²⁴ Consequently, the global impact was impressive, economic losses immense and in addition, a large number of jobs were at stake, in particular in the United Kingdom. Even today, an intense fear remains, because it cannot be predicted until when the incidence of the disease will continue to increase in humans.

Conclusions

Because it is well established that the measles virus and hepatitis C virus cause slowly developing diseases, it was difficult to admit that TSEs might reproduce by way of another type of infectious agent, that they might propagate without the participation of a nucleic acid. As yet, such ideas are not accepted by the entire scientific community.

Nevertheless, research on TSEs has advanced rapidly and the protein responsible for the disease has been described. In summary, it is known that the pathogenic PrP^{SC} protein differs from the normal PrP^C protein by the following criteria: *a*) it is resistant to physical and chemical treatments, *b*) it contains a high proportion of β -sheets, *c*) it loses the capacity to bind copper ions, *d*) it interacts with plasminogen, and *e*) it is destroyed by compounds such as quinacrine and chlorpromazine derivatives.

It is important to question whether mammals are the only organisms to contain prion proteins. This is not the case. Indeed, it has been demonstrated that yeast proteins such as Sup35p and Ure2p that contain regions rich in glutamine and asparagine (Q and N), are also responsible for the transmission of a non Mendelian trait similar to prions. In both cases, the phenomenon results from a modified conformation of the normal protein converting it into the abnormal form.^{9,78,79} In addition, aggregates of fibrillar proteins that form β -sheets and amyloids, and propagate alone, can be mediated by the Q- and N-rich regions.⁸⁰ These results led to the search for such Q- and N-rich regions in proteins known to be involved in prion diseases. Such regions are more common in eukaryotes than in prokaryotes, and form a pool of prion-like proteins.⁸¹ Hence, it is likely that it will become possible to predict or demonstrate the presence of yet unknown prion proteins.

Another equally important question concerns the prognosis and the evolution of TSEs in cattle and humans. With respect to cattle, it is surprising that, in addition to the United Kingdom, other countries did not report larger numbers of cases of BSE, since after the critical period of 1985, more than 50 000 cows were exported from the United Kingdom to other countries. A few cases of BSE have been reported in native cattle in a few European countries, but it is believed that in most cases the disease was contracted through the use of MBM imported from countries afflicted with BSE. The surprise is even greater if one considers that in 1990 more than 70 000 tons of MBM were exported from the United Kingdom to European countries as pig and chicken feed. Concerning cattle, various mathematical models had predicted that by the end of 2000, BSEs would have been nearly eradicated, and this is different from what is observed. It is hence not excluded that other routes could also lead to misfolding of the prion protein. Recently, Japan reported the first case of a cow from a dairy farm infected with BSE born outside of Europe. It is still unknown how this animal became infected.⁸²

With respect to humans, it is extremely difficult to predict how many cases of vCJD are likely to appear in the future. However, based on our present knowledge, certain models predict a dramatic increase of this fatal disease, with as many as 136 000 cases by the year 2040.⁴⁸ Nevertheless, regardless of these contradictory results, it has been demonstrated that milk and muscle tissues from beef can be ingested without danger.⁸³

In spite of all the disturbing aspects described regarding TSEs, it has not been possible to exactly establish the mode of action of these diseases. Nevertheless, it is possible that other, as yet unknown, models exist to explain how these diseases are transmitted.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Jorge Ossa Londoño for his scientific support and constructive discussions; we also thank Dr. Manuel Rodríguez for his careful revision of the manuscript, and the members of the Inmunovirología Group, Universidad de Antioquia as well as Colciencias for financial support. The present work was also partly financed by the CNRS (France).

Cuadro 1
PRINCIPALES ENFERMEDADES PRIÓNICAS*
PRINCIPAL PRION DISEASES*

<i>Disease</i>	<i>Mechanism of transmission</i>	<i>Host</i>
CJD (Creutzfeldt-Jacob Disease)		
Iatrogenic (iCJD)	Acquired	Humans
Familial (fCJD)	Hereditary	”
Sporadic (sCJD)	?*	”
Variant (vCJD)	Acquired	”
GSS (Gerstmann-Sträussler-Scheinker)	Hereditary	”
FSI (Fatal sporadic insomnia)	? [†]	”
FFI (Fatal familial insomnia)	Hereditary	”
Kuru	Acquired	”
Scrapie	Acquired	Sheep
BSE (Bovine spongiform encephalopathy)	Acquired	Bovine
TME (Transmissible mink encephalopathy)	Acquired	Mink
CWD (Chronic waste disease)	?	Deer, elk
FSE (Feline spongiform encephalopathy)	Acquired	Feline

*Adapted from ref. 1.

[†] Somatic mutation produced during transcription.

Cuadro 2
CLASIFICACIÓN DEL RIESGO POTENCIAL DE LOS TEJIDOS DEL BOVINO PARA LA TRANSMISIÓN DE EEB Y DE LOS TEJIDOS DEL HUMANO PARA LA TRANSMISIÓN DE vECJ
POTENTIAL RISK OF BOVINE TISSUES FOR BSE TRANSMISSION AND OF HUMAN TISSUES FOR vCJD TRANSMISSION

<i>Risk level</i>	<i>Bovine tissues*</i>
High risk	Brain; spinal column; eye; small intestine
Medium risk	Bone marrow; cerebrospinal fluid; lymph nodes; spleen; tonsil; dura mater; placenta; pineal, pituitary and adrenal glands
Low risk	Liver; lung; peripheral nerves; serum; blood; colon; nostrils; pancreas; thymus
No detectable infectivity	Skeletal muscle; heart; kidney; fat; milk; udder; uterus; ovary; testis; thyroid; bone; cartilage; hair; skin
<i>Risk level</i>	<i>Human tissue[†]</i>
High risk	Brain; spinal cord; eye
Low risk	Cerebrospinal fluid; kidney; liver; lung; lymph nodes; spleen; placenta
No detectable infectivity	Adipose tissue; adrenal gland; gingival tissue; heart muscle; intestine; peripheral nerve; prostate; skeletal muscle; testis; thyroid gland; faeces; milk; nasal mucous; saliva; semen; serous exudate; sweat; tears; urine Blood [‡]

* Adapted from ref. 52.

[†] Adapted from ref. 72.

[‡] The results of experimental investigations on the infectivity of blood have been conflicting; nevertheless, although infectivity has been detected, it is present in very low amounts and there is no indication of transmission of vCJD by transfusion.

Cuadro 3
 NÚMERO DE CASOS DE EEB (HASTA NOVIEMBRE DE 2001) Y DE vECJ (HASTA JUNIO DE 2001) NOTIFICADOS EN EUROPA *
 NUMBER OF CASES OF BSE (TO NOVEMBER 2001) AND OF vCJD (TO JUNE 2001) REPORTED IN EUROPE*

<i>Country</i>	<i>BSE</i> [†]	<i>vCJD</i>
United Kingdom	>180.000	101
Ireland	756	1
Portugal	605	-
France	443	3
Switzerland	396	-
Germany	121	-
Spain	73	-
Belgium	54	-
Italy	38	-
Holland	21	-

* Data from ref. 58, 66, 67.

[†] Countries with more than ten reported cases.

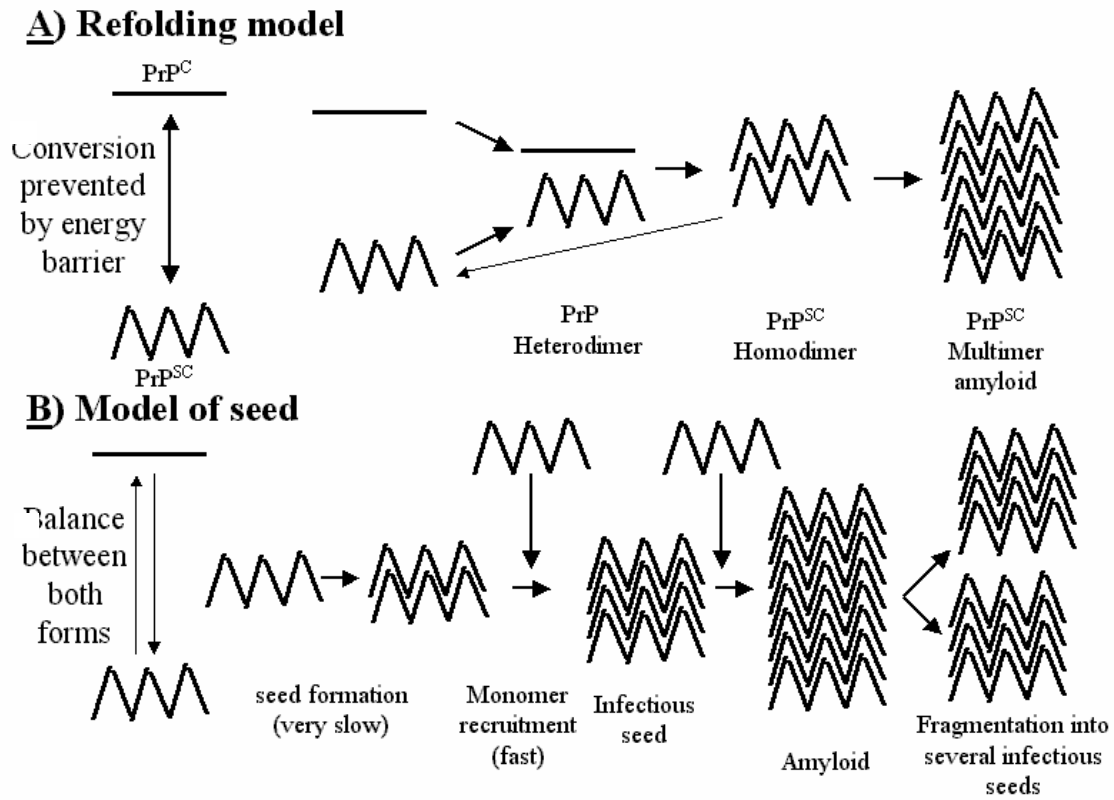


Figura 1. Modelos de formación de PrP^{SC}. A) Modelo de repliegado; B) Modelo de semilla. Adaptado de referencia 5.

Figure 1. Models for the formation of PrP^{SC}. A) Refolding model; B) Seeding model. Adapted from ref. 5.

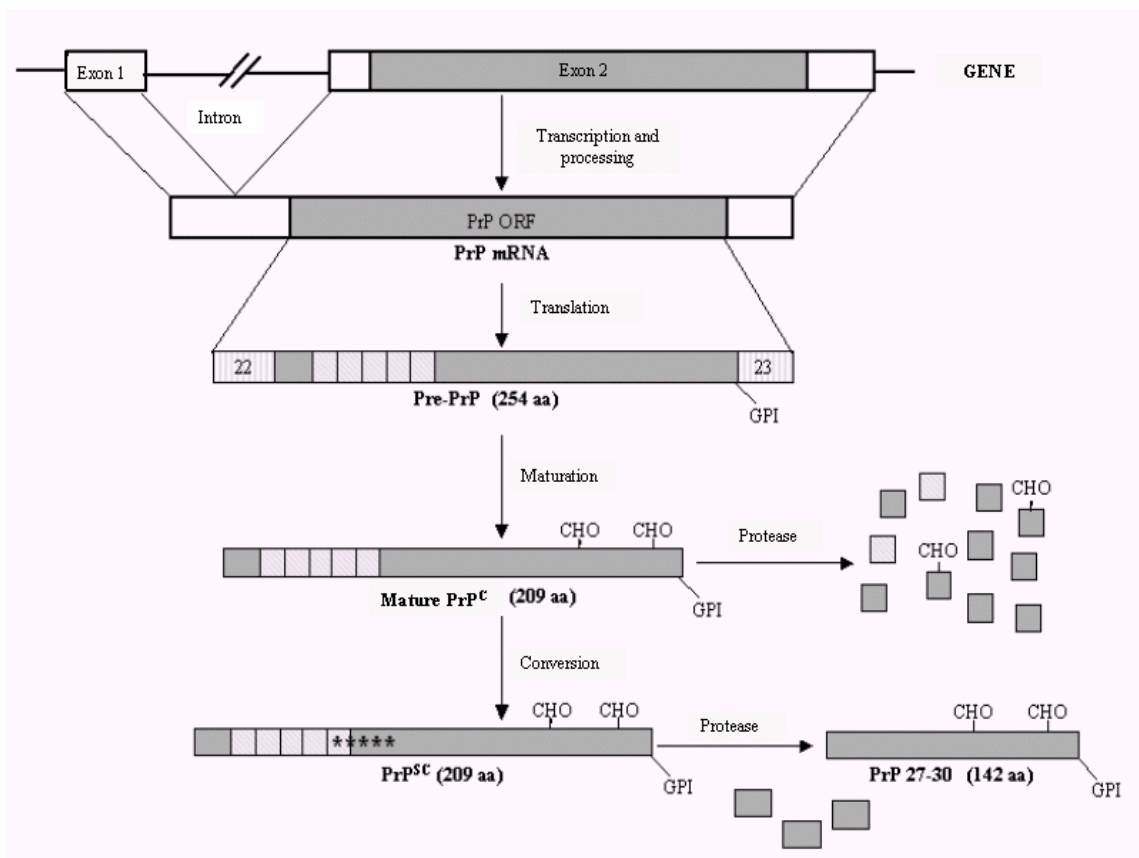


Figura 2. Expresión de proteínas humanas PrP^C y PrP^{SC} desde su gen.

□: Repeticiones de octapeptido; 22: y 23: Tamaño del péptido señal N-terminal y C-terminal, respectivamente; CHO: Sitios de glicosilación; GPI: Sitio de unión a glicosyl-fosfatidilinositol; *: Sitios

sensibles a proteasa; □: Péptidos resultantes del corte por proteasas.

Adaptado de ref. 2 y 5.

Figure 2. Expression of the human proteins PrP^C and PrP^{SC} from their gene.

□: Octapeptide repeats; 22: and 23: Aa size of the N-terminal and C-terminal signal sequences, respectively; CHO: Glycosylation sites; GPI: Site of binding to glyco-phosphatidylinositol; *: Proteinase

sensitive sites; □: peptides resulting from protease cleavage

Adapted from ref. 2, 5.

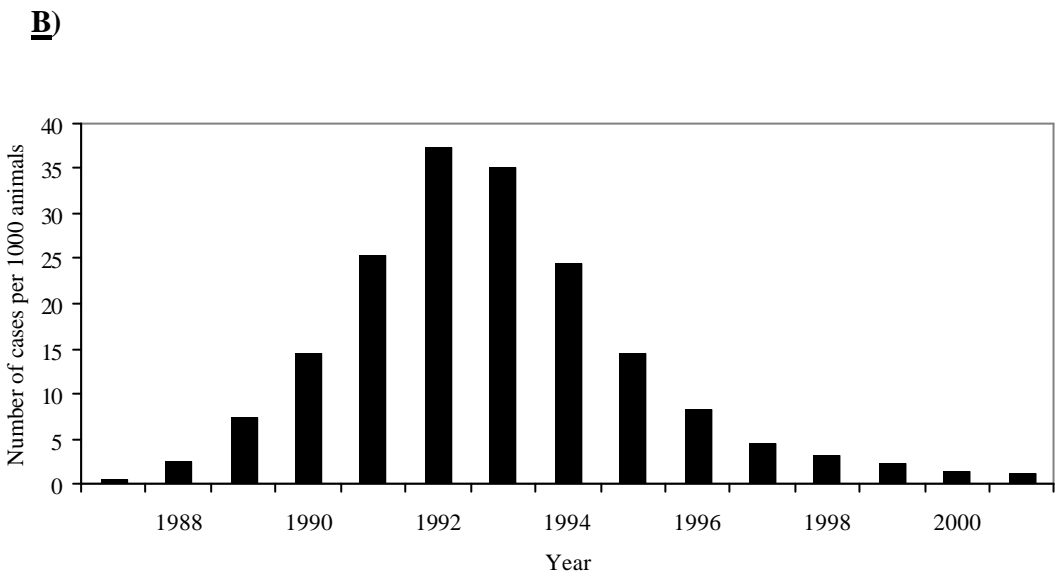
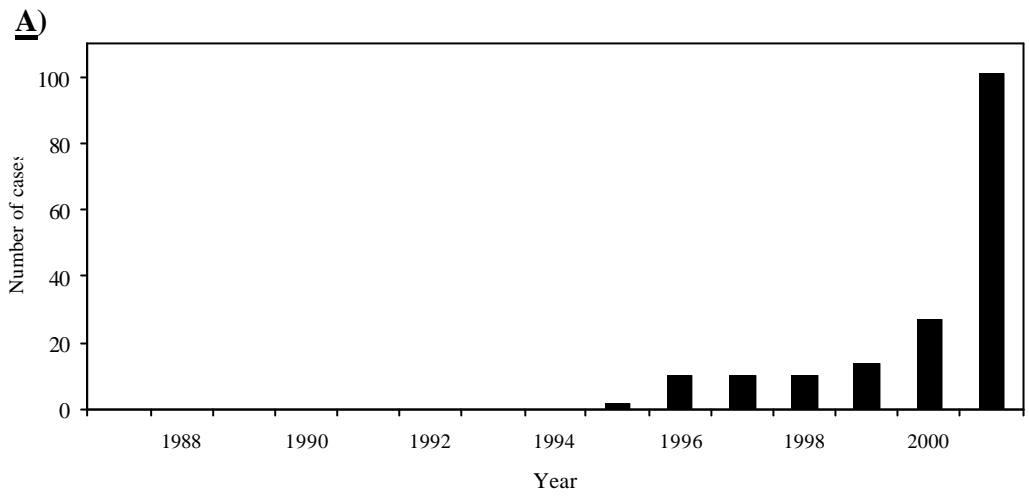


Figura 3. Número de casos de vECJ y EEB en el Reino Unido, entre 1987 y 2001.

A) vECJ: número absoluto de casos hasta junio de 2001

B) EEB: Número de casos por mil hasta noviembre de 2001

Adaptado de ref. 58, 66.

Figure 3. Number of cases of vCJD and BSE in the United Kingdom from 1987 to 2001.

A) vCJD: Total number of cases to June 2001

B) BSE: Number of cases per thousand animals, to November 2001

Adapted from ref. 58, 66.

Referencias

1. Gajdusek DC. Infectious amyloids; subacute spongiform encephalopathies as transmissible cerebral amyloides. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. New York: Lippincott Raven Publishers.1996:2851-2900.
2. Prusiner SB. Prions. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. New York: Lippincott Raven Publishers.1996:2901-2950.
3. Cohen FE, Prusiner SB. Pathologic conformations of prion proteins. *Ann Rev Biochem* 1998;67:793-819.
4. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13363-13383.
5. Aguzzi A, Heppner FL. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ* 2000;7:889-902.
6. Jackson GS, Clarke, AR. Mammalian prion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:69-74.
7. Jackson GS, Collinge, J. Prion disease - the propagation of infectious protein topologies. *Microbes Infect* 2000;2:1445-1449.
8. Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS. Prions: health scare and biological challenge. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001;2:118-126.
9. Caughey B, editor. Prion proteins. *Adv Prot Chem*. 2001; 57.
10. Caughey B, Chesebro B. Transmissible spongiform encephalopathies and prion protein interconversions. *Adv Virus Res* 2001;56:277-311.
11. Aguzzi A, Brandner S, Fischer MB, Furukawa H, Glatzel M, Hawkins C, et al. Spongiform encephalopathies: insights from transgenic models. *Adv Virus Res* 2001;56:313-352.
12. Schwartz M. Comment les vaches sont devenues folles. Paris, France: Odile Jacob, Publications. 2001.
13. Polo JM. Historia y clasificación de las enfermedades prionicas humanas. *Rev Neurol* 2000;31:137-141.
14. Eigen M. Priones y encefalopatía espongiforme bovina. *Invest Cienc* 2001;298:74-83.
15. Brown P, Will R, Bradley R, Asher D, Detwiler L. Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerg Infect Dis* 2001;7: 6-16.
16. Cuillé J, Chelle PL. Pathologie animale - la maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C r Acad Sci (D) Paris* 1936;203:1552-1554.
17. Chandler RL. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1961; 1: 1378-1379.
18. Marsh RF, Kimberlin RH. Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J Infect Dis* 1975;131:104-110.
19. Brown P, Gajdusek DC. Survival of scrapie virus after 3 years' interment. *Lancet* 1991; 337:269-270.
20. Hadlow WJ. Scrapie and kuru. *Lancet* 1959;2:289-290.
21. Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. Pathology of kuru. *Lab Invest* 1959;8:799-847.
22. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a kuru-like syndrome in chimpanzees. *Nature* 1966;209:794-796.
23. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* 1967;155:212-214.
24. Collee JG, Bradley R. BSE: a decade on-Part 1. *Lancet* 1997;349:636-641.
25. Fishbein L. Transmissible spongiform encephalopathies, hypotheses and food safety: an overview. *Sci Total Environ* 1998; 217:9871-9882.
26. Ossa JE, Machado G, Giraldo MA, McEwen JG. Prion plaques: molecular tumors. A hypothesis on the etiopathogenesis of prion diseases. *Med Hypotheses* 1995;44:124-126.
27. Wadsworth JDF, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge, J. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001;358:171-180.

28. Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, et al. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10069-10074.
29. Brown P, Rau EH, Johnson BK, Bacote AE, Gibbs CJ, Gajdusek DC. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600°C suggests an inorganic template of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3418-3421.
30. Jackson GS, Murray I, Hosszu LLP, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8531-8535.
31. Shaked Y, Rosenmann H, Hijazi N, Halimi M, Gabizon R. Copper binding to the PrP isoforms: a putative marker of their conformation and function. *J Virol* 2001;75:7872-7874.
32. Brown DR. Copper and prion disease. *Brain Res Bull* 2001;55:165-173.
33. Piccardo P, Safar J, Ceroni M, Gajdusek DC, Gibbs CJ. Immunohistochemical localization of prion protein in spongiform encephalopathies and normal brain tissue. *Neurology* 1990;40:518-522.
34. Hansen LA, Masliah E, Terry RD, Mirra SS. A neuropathological subset of Alzheimer's disease with concomitant Lewy body disease and spongiform change. *Acta Neuropathol* 1989;78:194-201.
35. Zahn R, Liu A, Lühns T, Riek R, Von-Scroetter C, López-García F, et al. NMR solution structure of human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:145-150.
36. López-García F, Zahn R, Riek R, Wüthrich K. NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8334-8339.
37. Pan KM, Baldwin MA, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of β -helices into β -sheet feature in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10962-10966.
38. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993;73:1339-1347.
39. Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, et al. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 1997;390:74-77.
40. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, et al. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 2001;412:739-743.
41. Economic impact of BSE on the UK economy, report to UK agricultural departments & treasury. Edimburg: DTZ Pieda Consulting, 1998. En: <http://www.bse.org.uk/files/mb/m11/tab02.pdf> (Revisado en Noviembre de 2001)
42. Ferguson NM, Donnelly CA, Woolhouse ME, Anderson RM. The epidemiology of BSE in cattle herds in Great Britain. II. Model construction and analysis of transmission dynamics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997;352: 803-838.
43. Marsh RF. Bovine spongiform encephalopathy: a new disease of cattle? *Arch Virol Suppl* 1993;7:255-259.
44. Cohen CH, Valleron AJ. When did bovine spongiform encephalopathy (BSE) start? Implications on the prediction of a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease (nvCJD) epidemic. *Int J Epidemiol* 1999;28:526-531.
45. Ferguson NM, Donnelly CA, Woolhouse ME, Anderson RM. Estimation of the basic reproduction number of BSE: the intensity of transmission in British cattle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1999;266:23-32.
46. Goldwater PN. Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: implications for Australia. *Med J Aust* 2001;175:154-158.
47. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* 1991;128:199-203.
48. MacKnight C. Clinical implications of bovine spongiform encephalopathy. *Clin Infect Dis* 2001;32:1726-1731.

49. Maignien T, Lasmézas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* 1999;80:3035-3042.
50. Donnelly CA, Ferguson NM, Ghani AC, Wilesmith JW, Anderson RM. Analysis of dam-calf pairs of BSE cases: confirmation of a maternal risk enhancement. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1997;264:1647-1656.
51. Wilesmith JW, Wells GA, Ryan JB, Gavier-Widen D, Simmons MM. A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 1997;141:239-243.
52. Dixon B. Hindsight blinkers Britain's mad cow disease response. *Curr Biol* 2000;10:R847, R848.
53. Walton TE. The impact of diseases on the importation of animals and animal products. *Ann NY Acad Sci* 2000;916:36-40.
54. Patterson WJ, Painter MJ. Bovine spongiform encephalopathy and new variant Creutzfeldt-Jakob disease: an overview. *Commun Dis Public Health* 1999;2:5-13.
55. Lasmézas CI, Fournier JG, Nouvel V, Boe H, Marcé D, Lamoury F, et al. Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4142-4147.
56. Narang H. Origin and implications of bovine spongiform encephalopathy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;211:306-22.
57. Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 1991;352:340-342.
58. Variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). En: www.who.int/inf-fs/en/fact180.html (Fact Sheet No. 180; revisado en Junio 2001).
59. Hill AF, Desbruslais M, Joines S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997;389:448-450.
60. Will RG, Zeidler M, Stewart GE, Macleod MA, Ironside JW, Cousens S, et al. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jacob diseases. *Ann Neurol* 2000;47:575-582.
61. Lloyd SE, Onwuazor ON, Beck JA, Mallison G, Farall M, Targonski P, et al. Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6279-6283.
62. Collinge J, Beck J, Campbell T, Estibeiro K, Will RG. Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1996;348:56-57.
63. Moore RM, Xiang F, Monaghan J, Han D, Zhang Z, Edström L, et al. Huntington disease phenocopy is a familial prion disease. *Am J Hum Genet* 2001;69:1385-1388.
64. Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997;349:99-100.
65. Foulkes N. A new dimension to the vCJD epidemic: multiple QTL. *Trends Genetics* 2001;17:439.
66. Número de casos de encefalopatía espongiforme bovina señalados en el Reino Unido. En: www.oie.int/esp/info/es_esbru.htm (Revisado en Noviembre de 2001).
67. Número de casos de encefalopatía espongiforme bovina señalados en el mundo (con excepción del Reino Unido). En: www.oie.int/esp/info/es_esbmonde.htm (Revisado en Noviembre de 2001).
68. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jacob disease. *Ann Neurol* 1996;39:767-778.
69. Hecker R, Taraboulos A, Scott M, Pan KM, Yang SL, Torchi M, et al. Replication of distinct scrapie prion isolates is region specific in brains of transgenic mice and hamsters. *Genes Dev* 1992;6:1213-1228.
70. Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7620-7624.
71. Schulz-Schaeffer WJ, Tschöke S, Kranefuss N, Dröse W, Hause-Reitner D, Giese A, et al. The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 2000;156:51-56.

72. Ricketts MN. Infection control guidelines for TSEs in hospitals and home care settings. Abstract book. International Symposium on "Prion Diseases and Related Processes"; Les Pensières, France. Fondation Mérieux, Lyon, France. 2000: 69-73.
73. Chen ZL, Strickland S. Neural death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997;91:917-925.
74. Tsirka SE, Rogove AD, Strickland S. Neural cell death and tPA. *Nature* 1996;384:123-124.
75. Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, Schwarz HP, Aguzzi A. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 2000;408:479-483.
76. Caspi S, Halimi M, Yanai A, Sasson SB, Taraboulos A, Gabizon R. The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem* 1998;273:3484-3489.
77. Korth C, May BCH, Cohen FE, Prusiner SB. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9836-9841.
78. Wickner RB. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1994;264:566-569.
79. Serio TR, Lindquist SL. [PSI⁺]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1999;15:661-703.
80. Koo EH, Lansbury PT, Kelly IW. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9989-9990.
81. Michelitsch MD, Weissman JS. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11910-11915.
82. Dove A. US throws money at TSE research. *Nature Med* 2001;7:1075.
83. Collee JG, Bradley R. BSE: a decade on - Part 2. *Lancet* 1997;349:715-721.