

# ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES: ETIOLOGÍA, PATOGENIA E IMPORTANCIA ZONÓTICA

J.L. ROMERO-TREVEJO<sup>1,2</sup>, P.J. SÁNCHEZ-CORDÓN<sup>1</sup>, M. PEDRERA<sup>1</sup>, M.J. BAUTISTA<sup>1</sup>, A. BLANCO, V. MOLINA<sup>1</sup>, E. RUIZ-VILLAMOR<sup>3</sup>, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS<sup>1</sup>

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles constituyen un grupo de enfermedades neurodegenerativas y mortales provocadas por la acumulación en el Sistema Nervioso Central de un isómero anormal de la proteína prión celular, conocido como PrP<sup>sc</sup>. Esta acumulación es la responsable de la patología más frecuentemente encontrada en estos procesos, como son la activación de las células de glía, pérdida neuronal, formación de placas de amiloide y cambios espongiformes en las neuronas y neuropilo, que provocan la sintomatología característica de estas enfermedades. Está comúnmente aceptado que, después de una infección natural o experimental por vía oral, la PrP<sup>sc</sup> se acumula en células del sistema linforeticular, como los macrófagos de cuerpo tingible o las células dendríticas foliculares del tejido linfoide asociado al intestino y nódulos linfáticos mesentéricos, antes de su diseminación hacia el Sistema Nervioso Central a través de los nervios periféricos de la pared intestinal. Desde estas localizaciones, la PrP<sup>sc</sup> puede alcanzar posteriormente otros tejidos como los músculos mediante difusión centrífuga. La aparición de la variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en la especie humana como consecuencia del consumo de productos derivados del ganado vacuno contaminados con el agente causal de la Encefalopatía Espongiforme Bovina, ha puesto de manifiesto la importancia zoonótica

---

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

<sup>2</sup> Área de Hepatología y Terapia Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, 31008, Pamplona, España.

<sup>3</sup> Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada. Académico Numerario de la Real de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

y de salud pública de las enfermedades producidas por priones, cuyos avances en el conocimiento de su patogenia permitirá desarrollar futuras estrategias terapéuticas encaminadas al control de estos procesos desde sus fases más iniciales.

EET animales	EET humanas
Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)
Scrapie	variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vEVJ)
Síndrome de Desgaste Crónico (CWD)	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
Encefalopatía Transmisible del Visón	Insomnio Familiar Fatal
Encefalopatía Espongiforme Felina	Kuru

Figura. Clasificación de las EET que afectan a los animales y al hombre.

### 1. DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) comprenden un grupo de enfermedades neurodegenerativas que están causadas por la alteración en la estructura de una proteína normal de las células del hospedador, la proteína prión celular (PrPc). Entre las EET que afectan a los animales se encuentran el Scrapie de la oveja y la cabra, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) o el síndrome de desgaste crónico del ciervo y el alce (CWD, *Chronic Wasting Disease*), mientras que dentro de las que afectan a los humanos se incluyen la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y su variante (vECJ), el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal o el kuru. (1). Nosológicamente, las EET pueden agruparse con otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la Enfermedad de Parkinson, que se asocian con la producción de agregados de proteínas que se expresan constitutivamente y cuya toxicidad se relaciona con la patogenia de estos procesos (2). Sin embargo, la diferencia fundamental de las EET con estas otras enfermedades es su capacidad de transmisión o infectividad, característica que da lugar a la denominación del posible agente causal como prión (*proteinaceous and infectious*).

El origen de las EET puede ser genético, esporádico o infeccioso, habiéndose propuesto, aunque todavía no probado, que el agente causal podría ser la forma anormal de la PrPc. Los isómeros anormales de la PrPc asociados con las EET se han denominado PrPsc (*Scrapie*), PrPbse (*Bovine Spongiform Encephalopathy*), PrPcjd (*Creutzfeldt-Jakob Disease*), etc., de acuerdo con la enfermedad que producen, o más genéricamente, PrPd (*disease*) ó PrPres, recibiendo este nombre por resultar todas ellas parcialmente resistentes a la digestión enzimática por proteasas (3), siendo la característica patognomónica de todas las EET la acumulación de esta proteína al-

terada como consecuencia de un cambio conformacional de la PrPc, proteína de la membrana celular codificada y expresada constitutivamente por el hospedador (4). Diversos datos laboratoriales, entre los que se incluyen repetidos fracasos en el intento de detectar un agente infeccioso convencional, han consolidado la «hipótesis del prión» (5), mediante la cual, sería la PrPd la que constituiría predominantemente, si no exclusivamente, la unidad infecciosa en las EET. De acuerdo con esta hipótesis, el cambio conformacional estaría regido por la propia isoforma anormal de la PrPc o por una subfracción de la misma, que constituiría el agente infeccioso de estas enfermedades (6). Además, el acúmulo de esta proteína anormal en el Sistema Nervioso Central (SNC) sería el responsable de la aparición de las patologías más frecuentemente encontradas en estas enfermedades, como son la activación de las células de glía, la pérdida neuronal y los cambios espongiiformes o vacuolización, tanto de las neuronas como del neuropilo (7), no habiéndose descrito ningún tipo de patología en otros órganos o tejidos (8).

Los primeros trabajos encaminados a aislar el agente causal de estos procesos constataron varios hechos diferenciales con el resto de los agentes infecciosos conocidos, como son el largo periodo de incubación, la extraordinaria resistencia a los agentes físico-químicos convencionales o la ausencia de respuesta inmune frente a los mismos por parte del hospedador. Desde hace bastante tiempo se propuso que el agente causal de las EET debía ser una proteína autorreplicante, ya que la infectividad de estas enfermedades no se veía alterada tras la esterilización por calor o por agentes químicos. Después del descubrimiento de las fibrillas asociadas al Scrapie (FAS), de los agregados amiloides de la proteína prión y de la identificación de la PrPd como el mayor componente de la fracción infecciosa, la hipótesis de la proteína se transformó en la «hipótesis del prión» (5). Sin embargo, aunque el descubrimiento de la PrPd ha permitido un gran desarrollo en el conocimiento del papel de esta proteína en la susceptibilidad y patogenia de las EET, aún permanece sin resolverse la cuestión de si realmente puede relacionarse esta proteína con el agente causal infeccioso, existiendo todavía muchas dudas acerca de la etiología de estos procesos. Aun así, la evidencia más importante que apoya esta hipótesis es el descubrimiento de que la PrPd es la macromolécula predominante encontrada en las fracciones purificadas del agente infeccioso (3). Aunque algunos estudios indican que las EET pueden transmitirse sin la formación de PrPd detectable (9) o que los niveles de PrPd no necesariamente se correlacionan con los niveles de infectividad (10), esta proteína se encuentra ampliamente reconocida como la causante de estos procesos, siendo la empleada para el diagnóstico de estas enfermedades y como un dispositivo de seguimiento a la hora de investigar las vías que siguen los agentes infecciosos de las EET al distribuirse por el organismo (11).

### 1.1. Propiedades físico-químicas de la PrPc y PrPd

La PrPc humana está codificada por el gen *PRNP*, localizado en el brazo corto del cromosoma 20 (12) y expresado en gran cantidad por las neuronas, fundamentalmente en el cerebro, cerebelo, médula espinal e hipotálamo; además se expresa en prácticamente todos los tejidos de manera constitutiva, como pueden ser, y de forma variable según la especie, la tonsila, bazo, pulmón, riñón, gránulos de secreción de las células epiteliales del estómago e intestino, linfocitos, monocitos, plaquetas o eritrocitos (13-15). Esta sialoglucoproteína se sintetiza como una cadena polipeptídica de 253 aminoácidos que sufre diferentes transformaciones bioquímicas antes de anclarse a la membrana celular a través del glucosilfosfatidilinositol (GPI) (3,16,17) y cuyo peso molecular oscila entre 33 y 35 kilodalton (kDa) dependiendo del grado de glucosilación (17). Mediante análisis por resonancia magnética nuclear de PrPc recombinante de varias especies, se ha sugerido que todas contienen tres regiones de  $\alpha$ -hélice, dos de ellas unidas por un puente disulfuro, un segmento corto antiparalelo de láminas- $\beta$  y una zona flexible cerca del aminoácido 120, confiriéndole la estructura global de una proteína pequeña globular (16).

La PrPc es soluble en detergentes convencionales, sensible a la digestión enzimática y muestra un predominio de estructura  $\alpha$ -hélice en su conformación (18). Por el contrario, la PrPd, que tiene un tamaño de unos 15-40 nanómetros, es hidrofóbica (5) y posee un peso molecular de 27-30 kDa, siendo ligeramente soluble en detergentes no iónicos, y presentando, además, una relativa resistencia al tratamiento con proteinasa-K, que sólo elimina su extremo amino terminal (19). La resistencia a la proteólisis de la PrPd es una característica frecuentemente utilizada en el diagnóstico y estudios experimentales de estos procesos. Todas estas propiedades están directamente relacionadas con el incremento en el contenido de láminas-b, mayor del 30%, observado en la PrPd, lo que también explica su amiloidogenicidad natural, es decir, la gran tendencia que presenta para producir agregados y formación de fibrillas (18). Igualmente, resulta significativa la estabilidad termodinámica de esta proteína (20).

La secuencia primaria de aminoácidos de la PrPc y la PrPd es exactamente la misma, siendo esta la razón por la que la PrPd sólo se reconoce en el contexto de la enfermedad, tras desarrollar la PrPc ciertas modificaciones más relacionadas con cambios en su estructura conformacional que con cambios covalentes. Además, la cantidad de ácido ribonucleico mensajero para la PrPc no se ve incrementada en el cerebro en el transcurso de alguna de estas enfermedades, como el Scrapie, por lo que se descartaría una síntesis *de novo* de la proteína anormal.

Un aspecto determinante en el desarrollo de las EET es el referente a la homología, y consecuente estructura, en la secuencia primaria de aminoácidos de la PrPc entre las especies donantes y receptoras del prión. En este sentido, la PrPc del ratón y del hámster son homólogas con la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína humana en un 87% y 89% respectivamente, presentando a su vez la PrPc de estas especies de roedores escasas diferencias aminoacídicas entre sí (21). Igualmente, se ha demostrado que existe un alto nivel de identidad estructural entre la PrPc humana y la bovina (22), planteándose la posibilidad de que la transmisibilidad podría estar también afectada por la similitud en las estructuras secundaria (plegamiento que adopta la cadena polipeptídica gracias a la formación de enlaces de hidrógeno, dando lugar a la formación de  $\alpha$ -hélices y láminas  $\alpha$ ) y terciaria (disposición tridimensional de la molécula proteica) entre los diferentes tipos de PrPc (20). De esta manera, se han podido realizar transmisiones a animales de la misma o de diferente especie, aunque en este último caso, la transmisión se produce con tiempos de incubación más largos, al producirse el fenómeno conocido como «barrera de especie». Sin embargo, mediante dos o más pases del prión en la misma especie, realizados a través de la inoculación secuencial de material infectivo procedente de individuos que han sufrido la enfermedad, se obtienen parámetros de transmisión más parecidos a los obtenidos en la transmisión intraespecífica, con una disminución en el periodo de incubación. Además de las diferencias en la homología estructural entre la PrPc y la PrPd, la transmisión también parece depender de la dosis del inóculo (23).

Aunque la función biológica de la PrPc permanece aún sin esclarecer, se le han atribuido diversas actividades, como la participación en la transmisión sináptica (24), una función neuroprotectora en relación con la apoptosis (25,26) o una intervención en el metabolismo neuronal del cobre (27,28). El mecanismo por el cual el cobre se une a la PrPc y si esto tiene alguna función en la patogenia de las EET todavía no ha sido aclarado. Sin embargo, se ha demostrado que la PrPd pierde la resistencia a la digestión enzimática y la transmisibilidad como consecuencia de la desnaturalización parcial, propiedades que puede recuperar gracias a las uniones con este metal (29).

## 1.2. Cepas de PrPd

La adaptación de un prión a una nueva especie hospedadora se produciría, como se ha comentado anteriormente, a través de diferentes pases en los que tendrían lugar diferentes cambios estructurales en la molécula de PrPd. De la misma manera, el agente causal de una determinada EET puede sufrir algún tipo de modificación en su

estructura, dando lugar a moléculas con diferentes características y que pueden mostrar una diversidad biológica similar a las cepas de otros agentes patógenos clásicos como son los virus. La existencia de diferentes cepas de PrPd se ha establecido tras el descubrimiento de la aparición de características diferentes dentro de una misma enfermedad, incluyendo distintos síntomas clínicos y periodos de incubación, distribución de las lesiones en el cerebro tras la transmisión de la EET en cuestión a ratones de diferentes genotipos o grado de glucosilación de la PrPd y peso molecular (30,31). Este hecho se ha demostrado más ampliamente en el Scrapie natural, mientras que en la EEB, por el contrario y hasta hace poco tiempo, siempre se había reconocido una cepa única y estable del agente causal (32,33). En cualquier caso, la diversidad en las cepas de Scrapie continúa siendo materia de controversia (34,35), quedando aún por determinar cómo el agente causal puede portar esa información biológica específica de cada cepa, especialmente en el marco de la «hipótesis del prión» (36).

Aunque todavía no se ha demostrado la presencia de genoma alguno, estas diferencias podrían ser explicadas por mutaciones en los ácidos nucleicos en el supuesto de que las EET estuvieran causadas por un virus, mientras que de acuerdo con la «hipótesis del prión», algunos datos sugieren que serían determinadas variaciones estructurales en la PrPd las que podrían albergar propiedades específicas (19,31,37). En este sentido, se han encontrado diferentes características en la proteína PrPd en ratones infectados con diferentes cepas biológicas de Scrapie, como los distintos patrones electroforéticos obtenidos por western blot (38-40), que se han descrito igualmente en otras EET (37). Los criterios existentes para demostrar la diversidad molecular de la PrPd incluyen los cocientes entre las formas di-, mono- y no glucosilada, sus respectivos pesos moleculares y las resistencias a tratamientos enzimáticos de larga duración. Además, la caracterización inmunológica de la PrPd podría permitir la demostración, acorde con la diversidad molecular, de un número mucho mayor de lo esperado de cepas del agente productor del Scrapie (36).

Mientras se discute la implicación de otros componentes moleculares independientes de la PrPd y del hospedador como portadores de información (35), algunos estudios han propuesto que las cepas pueden modificar su conformación cuando se propagan en la misma especie hospedadora (41,42). En cualquier caso, la relación existente entre las diferentes cepas del agente infeccioso en las enfermedades naturales continúa siendo poco comprendida, aunque las características de las mismas podrían emplearse para seguir la posible transmisión de estos agentes a diferentes especies (43,44). La demostración de que el agente causal de la EEB se ha transmitido muy probablemente desde el ganado vacuno hasta los humanos (45), a través de

estudios en los que no se observaron diferencias significativas en las características de la enfermedad desarrollada entre animales inoculados con EEB y con la vECJ (46,47), ha puesto en marcha la realización de estudios moleculares sobre la PrP<sup>d</sup> en otras EET humanas y animales, junto con la caracterización de los agentes infecciosos en modelos murinos experimentales. Igualmente, el reciente desarrollo de ratones transgénicos que expresan la proteína prión de los hospedadores naturales de las EET, ha ofrecido nuevas oportunidades para la caracterización biológica y molecular de los agentes infecciosos implicados en estas enfermedades (36). De esta manera, distintos trabajos han podido demostrar que existirían al menos dos o tres cepas distintas de priones que producirían la EEB en el ganado vacuno (48,49).

Todos estos descubrimientos han sido en parte consecuencia del incremento de los programas de vigilancia epidemiológica de las EET, especialmente en Europa. La existencia de diferentes cepas de priones productoras de la misma enfermedad pero con diferentes características electroforéticas y biológicas ha llevado a la creación del término «EET atípicas». Esta denominación está cada vez más aceptada en el caso del Scrapie atípico, donde distintos trabajos han demostrado la aparición de cinco bandas en el patrón electroforético, en lugar de las tres que aparecen en la forma clásica de la enfermedad, así como la afectación de ovejas con genotipos tradicionalmente considerados resistentes (19).

## 2. PATOGENIA

A pesar de la existencia de múltiples controversias relacionadas con la patogenia de las EET, está comúnmente aceptado que las diferentes etapas que tienen lugar después de una infección natural o experimental por vía oral con la PrP<sup>d</sup> son acumulación en el tejido linfoide, diseminación hacia el sistema nervioso periférico (SNP), ascensión y diseminación por la médula espinal y encéfalo y difusión centrífuga desde el SNC hacia otros tejidos, como los músculos. Asimismo, la existencia de una etapa hematogena, tanto en fases preclínicas como clínicas de la enfermedad, está también aceptada en determinadas EET tanto naturales como experimentales (7).

Está demostrado que la transmisión de las EET se puede producir de forma experimental a través de su inoculación por diferentes vías, o de forma natural por ingestión de material contaminado con tejidos infectados (3). Un ejemplo constatado de este hecho, causante de un gran debate en la opinión pública, es la diseminación de la EEB entre el ganado vacuno mediante la alimentación con suplementos alimenticios contaminados (50) o, más recientemente, la aparición de la vECJ en el ser hu-



mano (46,51), consecuencia igualmente de la ingesta del prión a través de alimentos contaminados. Una vez en el interior del organismo y cualquiera que sea la naturaleza del agente infeccioso, la expresión de la PrPc es un requisito indispensable para el desarrollo de las EET (4), es decir, que para soportar una infección, la célula hospedadora debe necesariamente expresar el isómero celular de la proteína prión (52). Este hecho ha sido determinado experimentalmente al demostrarse que ratones que no expresan la PrPc (PrP *knockout*) son resistentes a la infección por Scrapie (53,54). Además, parece que la expresión de la PrPc en tejidos periféricos es necesaria para la llegada de la infección al SNC (55-57), por lo que las células que expresan la PrPc son, de esta manera, candidatas para sufrir los cambios conformacionales inducidos por el agente causal (4).

Los mecanismos exactos por los cuales tiene lugar la conversión de la PrPc en PrPd permanecen sin aclarar, aunque lo más probable es que se produzca una transformación por etapas en la que la PrPc va adquiriendo poco a poco las propiedades biofísicas anormales de la PrPd (58,59). Además, no se conoce el lugar donde ocurre esta conversión, señalándose como posibles sitios para la transformación los denominados microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos resistentes a detergentes (MRD) de la membrana celular (58) o los endosomas (60), aunque el retículo endoplásmico podría participar también en el proceso, especialmente en las EET humanas de origen genético (61). Los MRD, estructuras de la membrana celular con una composición bioquímica determinada, podrían ser, además, lugares importantes para la internalización de la PrPd, ya que la conversión parece necesitar la inserción de esta proteína en la membrana celular, posiblemente mediante intercambio de partículas de membrana o por mecanismos relacionados con el GPI del extremo C-terminal de la molécula. Otros experimentos han demostrado la necesidad de una contigüidad física entre la PrPc y la PrPd para que se produzca la transformación (62). En cualquier caso, una vez formada, la PrPd parece actuar como una plantilla para la conversión de la PrPc en la forma anormal productora de la enfermedad, mediante un proceso de amplificación favorecido por la presencia de la propia proteína anormal (63,64).

Por lo tanto, se puede considerar que la patogenia de las EET en los órganos periféricos incluye un primer contacto entre el agente infeccioso y los tejidos diferentes al SNC (fase linforreticular), y la conducción del agente hasta estos órganos (neuroinvasión).



## 2.1 Fase linforreticular

En el momento actual, los datos experimentales de los que se dispone sobre la implicación de los tejidos linfoides en la patogenia de las EET permiten contemplar varias posibilidades en función del hospedador, la cepa del prión involucrado y la infectividad del inóculo. En un principio, parecería lógico suponer que la función del tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) es esencial a la hora de favorecer la diseminación de los priones tras una administración oral. Sin embargo, parece claro que esta función no es universal para todas las cepas de priones, sino que, más bien, depende de la dosis infectiva (52). Así, dependiendo del hospedador, otros órganos del Sistema Linforreticular (SLR) diferentes al TLAI, en particular el bazo y los nódulos linfáticos (65), constituyen sitios de replicación y acumulación de la PrPd, tal y como se observa en el Scrapie de las ovejas, en infecciones experimentales de EEB en ovejas y de Scrapie en ratones, así como en la vECJ humana. Además, aunque en un primer momento no se pudo asociar la invasión del TLAI con la patogenia de la EEB en el ganado vacuno (66), este hecho también se ha podido demostrar finalmente en esta enfermedad (67).

En el proceso de invasión de los órganos linfoides concurren probablemente varias fuerzas contrapuestas; por un lado, la captación del prión por parte de células especializadas que expresan PrPc en su superficie, en donde tendría lugar un primer proceso de replicación y, por otro, la capacidad fagocítica de células migratorias como los macrófagos y las células dendríticas, suficiente para destruir pequeñas cantidades del agente infeccioso. Sin embargo, si la acumulación del isómero patógeno superase un determinado umbral que desbordara la capacidad de degradación, estas mismas células podrían ser las responsables de la difusión del agente hacia otros territorios (52).

Un acontecimiento muy temprano que ocurre en la patogenia periférica de algunas EET, como el Scrapie natural, es la acumulación de priones en el SLR del hospedador (68,69) mucho antes que en el SNC, concretamente en el bazo, nódulos linfáticos y TLAI, donde se pueden detectar en cantidades importantes, viéndose facilitada la invasión de las terminaciones nerviosas presentes en estos territorios por la acumulación de PrPd en las células del tejido linfoide periférico (70). Esta asociación de determinados tejidos y células linfoides con la infectividad del Scrapie y la ECJ en infecciones experimentales se conoce desde hace tiempo, habiéndose comprobado que los tiempos de incubación tras la inoculación del Scrapie en ratones esplenectomizados o con asplenia genética eran más largos que en los ratones control. Sin embargo, tanto en el caso de la ECJ de origen esporádico como en el de la

EEB, la replicación parece estar más restringida al tejido nervioso (71,72), por lo que la implicación de los tejidos linfoides en la patogenia de las EET parece estar en función del tipo de príon o de la especie hospedadora (52).

Las distintas poblaciones de células inmunocompetentes son objeto de numerosos estudios encaminados a delimitar el papel real de cada una de ellas en la patogenia de estas enfermedades. Mientras que en el SNC, la neurona se presenta como la principal célula responsable para la replicación del agente infeccioso (73), en el SLR, los lugares más importantes en los que se produce la acumulación de la PrPd son los folículos linfoides. Así, en trabajos en los que se empleó radiación gamma para eliminar células mitóticas o en proliferación, se ha podido comprobar que la acumulación del príon después de la inoculación de ratones con cepas de Scrapie adaptadas tiene lugar en células diferenciadas, post-mitóticas y de extensa vida media, como los linfocitos, las células dendríticas foliculares (CDF) o los macrófagos. Igualmente, mediante el empleo de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y de microscopía electrónica, se ha demostrado que el príon que se acumula en los tejidos linfoides se encuentra preferentemente en las CDF y en los lisosomas de los macrófagos de cuerpo tingible (MCT) localizados en los centros germinales de los folículos linfoides (69,74,75). De esta manera, se pueden distinguir dos patrones de acumulación, uno asociado con la distribución reticular en las CDF y otro relacionado con la deposición granular de esta proteína en los MCT (11).

Las CDF se muestran como una de las principales células blanco para la acumulación y replicación del agente de las EET, interviniendo además en los procesos de proliferación de los linfocitos B. (76,77). Las CDF constituyen una línea celular diferente a las células dendríticas migratorias derivadas de la médula ósea, considerándose que proceden de precursores estromales y no presentando actividad fagocítica ni capacidad de migración (8,78). Dada la relación directa existente entre las poblaciones de linfocitos B y CDF, mediante la cual, ambos tipos celulares se necesitan mutuamente para el desarrollo de sus funciones (79), algunos estudios han demostrado que, en ratones, la presencia de linfocitos B maduros tiene influencia sobre el curso de la infección (80,81), debido a su capacidad para afectar en la maduración de las CDF proveyendo factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumor necrosis factor*)-á y linfoxina á/â a los órganos linfoides (76,82). Además, ratones que carecen de linfocitos B no desarrollan la enfermedad después de una inoculación intraperitoneal (80,82). Sin embargo, y aunque en los linfocitos B del bazo puede detectarse el príon (57), no está claro si el papel de esta población celular se restringe al mantenimiento de las CDF o pueden estar involucrados en la diseminación del agente (82). En otros

trabajos, los resultados muestran que los priones tendrían preferencia por otros tipos celulares del SLR, hecho que se vería influenciado por el tamaño del inóculo administrado (11), cepa empleada, vía de administración o características de los animales utilizados. De esta manera, al igual que las CDF, los macrófagos también podrían estar involucrados en la acumulación del prión tras una infección periférica, es decir, por una vía diferente a la intracerebral. Sin embargo, la disminución experimental de la población de macrófagos incrementa la acumulación de PrPd en el bazo y reduce significativamente los tiempos de incubación en experimentos realizados en ratones (83), por lo que estas células podrían jugar un papel fundamental en la respuesta inmune frente a los priones. Sin embargo, la degradación lisosómica de la PrPd por parte de los macrófagos parece ser un fenómeno menos eficiente que la transformación de PrPc en PrPd (52), lo que favorecería su acúmulo y posterior diseminación.

En cualquier caso, y como se ha comentado anteriormente, tras la inoculación experimental periférica de PrPd en ratones susceptibles, es posible encontrar acumulación de esta proteína en el tejido linfoide (75,84) antes de detectarse en el SNC. Así, en ovejas infectadas con el agente causal del Scrapie se han encontrado acúmulos de PrPd en las placas de Peyer (PP) del TLAI (85), y en ciervos inoculados experimentalmente por vía oral con homogeneizados de cerebros procedentes de ciervos con CWD natural, la isoforma patógena de la proteína aparece en aquellos tejidos linfoides que drenan el íleon (86). La presencia de PrPd en el tejido linfoide se ha constatado también en la transmisión experimental de la EEB a ovejas (87) y a primates (88). En el hombre, la presencia de PrPd en el tejido linfoide se ha descrito únicamente en la vECJ (72,89), habiéndose podido demostrar, además, la implicación de los tejidos linfoides en la patogenia de la EEB (67).

## 2.2 Neuroinvasión

En una descripción clásica de la patogenia de las enfermedades priónicas, la replicación del prión en el SLR se vería continuada por la invasión del SNC, en la que, teóricamente, las dos posibilidades existentes para que se produzca la misma serían a través de las vías hematógica o neurógena.

La diseminación hematógica del agente hasta los órganos del SLR después de una infección periférica es una característica temprana y aceptada en el periodo de incubación del Scrapie experimental en roedores (90). Además, estudios recientes han demostrado la transmisión del prión a través de sangre de ovejas afectadas con EEB y Scrapie a animales de esta misma especie (91). Sin embargo, la implicación

secuencial de los órganos linfoides periféricos, médula espinal y cerebro tras una administración oral del agente es un argumento a favor de que la diseminación ocurra a través de los nervios periféricos (84,92), sin excluir del todo la posibilidad de que también participe la vía sanguínea.

La diseminación por vía neurógena también está apoyada por estudios que demuestran que la neuroinvasión puede alcanzarse igualmente en ratones con un sistema inmune alterado, o en ratones que no expresan PrPc en las células del SLR (70,93). Recientemente se ha demostrado que, después de una administración intraperitoneal de la PrPd, tanto la simpatectomía química como la inmunológica previene o retrasa el desarrollo del Scrapie. Las cantidades detectadas de prión en la médula espinal de ratones simpatectomizados disminuyeron drásticamente en fechas tempranas después de la inoculación, mientras que en ratones transgénicos cuyos órganos están hiperinervados por nervios simpáticos, se observó una reducción en el tiempo de incubación de esta enfermedad (94). Otros grupos de investigación han demostrado la vía directa de diseminación del agente hasta el cerebro a través del nervio vago (95). Las conclusiones que se pueden extraer de todos estos estudios es que la vía más probable por la que los priones pueden alcanzar el SNC es a través del SNP. Sin embargo, el modo exacto de transporte aún no se conoce, aceptándose tanto la vía axonal como la no axonal (11). Igualmente, la presencia del agente causal en el cerebro tras una administración periférica implica necesariamente que las vías de neuroinvasión deben ser aquellas que inervan los tejidos extraneurales donde los niveles de expresión de PrPc permitan la transformación y acumulación de la PrPd, como puede ser el caso de los plexos nerviosos mientéricos y submucosos del tracto intestinal, pertenecientes al Sistema Nervioso Entérico (SNE), después de una ingestión oral (84). Estos plexos se encuentran próximos a órganos del SLR asociado al tracto digestivo, como las PP y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), lugares que constituyen los sitios iniciales de replicación en ratones inoculados oralmente con priones de Scrapie o de EEB (96).

### 3. IMPORTANCIA ZONÓTICA

La importancia zoonótica de las EET y, en particular, de la EEB, radica en su posible transmisión a la especie humana a través del consumo de productos derivados del ganado vacuno contaminados con el agente causal, pudiendo producir la denominada vECJ. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1996 (45), desarrollándose desde entonces numerosos estudios bioquímicos, neuropatológicos y de transmisión que han demostrado su estrecha relación con la EEB (51).

El hecho de que la vECJ afectara a individuos con un intervalo de edad muy joven así como su patología característica, hizo pensar que podría representar una nueva forma clínica de EET. Además, la coincidencia de que los primeros pacientes aparecieran en el Reino Unido sugirió una asociación con la EEB del ganado vacuno. Posteriores experimentos mostraron una gran similitud entre la EEB y la vECJ basándose en los patrones de infectividad sobre diferentes cepas de ratones, como fueron la distribución de lesiones en el cerebro de estos animales, las características electroforéticas de las PrPd asociadas a ambos procesos o la neuropatología observada después de la transmisión a macacos (46,51,97,98). Basándose en estos datos, la mayoría de los autores están de acuerdo en afirmar que la vECJ representa la transmisión de la EEB del ganado vacuno a los humanos. Debido a que no existía ningún tipo de exposición ocupacional entre los pacientes enfermos y las vacas en granjas o mataderos, es probable afirmar que la transmisión podría haber ocurrido a través del consumo de productos cárnicos contaminados con EEB (3).

Hasta el momento se han comunicado alrededor de 180 casos de vECJ, la mayoría de ellos provenientes del Reino Unido. En nuestro país, y hasta los primeros meses de 2008, únicamente se han confirmado tres casos de la enfermedad. Debido a que no se conoce ni el periodo de incubación necesario para que se produzca la transmisión entre las vacas y los humanos, ni la dosis recibida por los pacientes afectados, no es posible predecir con seguridad el número de casos de vECJ que se espera en el futuro. Sin embargo, aunque la epidemia de EEB alcanzó el máximo en los años 1992-1993 y su incidencia ha disminuido considerablemente desde esa fecha gracias a las regulaciones que prohíben la alimentación de los ruminantes con restos de harinas animales, la incidencia de la vECJ en la especie humana es baja, sin conocerse de momento si se ha alcanzado o no el pico máximo en el número de casos. Sin embargo, a partir del año 2003, once años después de que la EEB alcanzara su máximo en el Reino Unido, la incidencia anual de la vECJ en los humanos ha ido disminuyendo paulatinamente. Este hecho sugiere que el hombre podría ser parcialmente resistente a la enfermedad inducida por el consumo de carne contaminada con EEB y/o que la dosis infectante a la que la gente ha estado expuesta sería bastante baja. En cualquier caso, parece probable que existen muchas más personas que han estado expuestos al agente productor de la EEB que las que han desarrollado posteriormente la enfermedad clínica (3).

En la actualidad, existe una nueva preocupación relacionada con el hecho de que algunos individuos expuestos a la EEB puedan ser portadores asintomáticos de la infección (23,99,100) y, en consecuencia, posibles transmisores de la enfermedad entre los humanos. La existencia de este problema potencial ha llevado a la necesi-

dad de emplear procedimientos adecuados de esterilización para el instrumental quirúrgico, aunque la recomendada utilización del autoclavado a altas temperaturas junto con el uso de hidróxido sódico (101) es difícil de aplicar en determinados casos. Igualmente, también ha sido ampliamente divulgada la posibilidad de que la sangre para transfusiones pudiera estar contaminada con el agente causal de la vECJ, posibilidad apoyada por la evidencia de que la EEB puede transmitirse entre ovejas a través de transfusiones sanguíneas (102). La consecuencia de estos hallazgos es que muchos países hayan establecido nuevas normas para disminuir el empleo de sangre procedente de donantes que pudieran haber estado expuestos a la EEB/vECJ en el Reino Unido durante la epidemia de EEB (3).

El perfil clinicopatológico de la vECJ ha permitido desarrollar ciertos criterios para poder realizar un diagnóstico *antemortem* de la enfermedad (103). De esta manera, y a diferencia de la ECJ clásica, los pacientes con vECJ son mucho más jóvenes, con una media de edad en el momento del fallecimiento de veintinueve años (104), careciendo de los cambios típicos en el electroencefalograma que se observan en la ECJ (103) y presentando el 60% de ellos síntomas psiquiátricos como ansiedad, insomnio o aislamiento. Las alteraciones neurológicas afectan en torno al 35% de los individuos al comienzo de la enfermedad, siendo los síntomas más comunes respuestas desagradables o dolorosas a los estímulos sensoriales. A los dos meses del inicio de la sintomatología, cerca del 60% de los pacientes muestran síntomas neurológicos, pero no es hasta más allá de los cuatro meses cuando estos signos se hacen más evidentes, con alteraciones motoras, dificultad al hablar y temblores. A partir de los seis meses, los individuos manifiestan movimientos involuntarios (disonía, corea o mioclonos), debilidad cognitiva y ataxia (104). La duración de la enfermedad es normalmente más larga que en la ECJ clásica, con una media de catorce meses, siendo el resultado inevitable del proceso la muerte en un estado vegetativo.

Neuropatológicamente, los cerebros de los pacientes con vECJ presentan cambios espongiiformes consistentes en vacuolización intracelular, además de pérdida neuronal y astrogliosis, más predominantemente en los ganglios basales y en el tálamo (3). Además, existe una gran cantidad de placas extensas de PrP<sup>sc</sup> en el cerebro y cerebelo, muchas de las cuales están rodeadas por vacuolas, dando lugar a la característica morfología de placas floridas (3,103), responsables de la sintomatología clínica de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Prusiner SB. Shattuck lecture: neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* 2001; 344: 1516-1526.
2. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416: 535-539.
3. Chesebro B. Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* 2003; 66: 1-20.
4. González L, Terry L, Jeffrey M. Expression of prion protein in the gut of mice infected orally with the 301V murine strain of the bovine spongiform encephalopathy agent. *J Comp Path* 2005; 132: 273-282.
5. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982 ; 216 : 136-144.
6. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13363-13383.
7. Beekes M, McBride PA. The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Journal* 2007; 274: 588-605.
8. Glaysher BR, Mabbott NA. Role of the GALT in scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol* 2007; 178: 3757-3766.
9. Lasmezás CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Peyrin V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 1997; 275: 402-405.
10. Shaked GM, Fridlander G, Meiner Z, Taraboulos A, Gabizon R. Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *J Biol Chem* 1999; 274: 17981-17986.
11. Press CMcL, Heggebo R, Espenes A. Involvement of gut-associated lymphoid tissue of ruminants in the spread of transmissible spongiform encephalopathies. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 885-899.
12. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252: 1515-1522.
13. Fournier JG, Escaig-Haye F, Billete de Villemeur T, Robain O, Lasmézas CI, Deslys JP, Dormont D, Brown P. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrPc) in extracerebral tissues. *Cell Tissue Res* 1998; 292(1): 77-84.
14. Holada K, Vostal JG. Different levels of prion protein (PrPc) expression on hamster, mouse and human blood cells. *Br J Haematol* 2000; 110(2): 472-480.
15. Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulrhart MB, Booth TF, McNicol A. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 2006; 107(10): 3907-3911.
16. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 1997; 413: 282-288.
17. Harris DA. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 429-444.
18. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10962-10966.
19. Baron T, Biacabe AG, Arsac JN, Benestad S, Groschup MH. Atypical transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ruminants. *Vaccine* 2007; 25: 5625-5630.
20. Collins SJ, Lawson VA, Masters CL. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 2004; 363: 51-61.



21. Priola SA, Chabry J, Chan K. Efficient conversion of normal prion protein (PrP) by abnormal hamster PrP is determined by homology at amino acid residue 155. *J Virol* 2001; 75: 4673-4680.
22. López-García F, Yahn R, Riek R, Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8334-8339.
23. Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10248-10253.
24. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994; 370: 295-297.
25. Kurschner C, Morgan JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 30: 165-168.
26. Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F. Overexpression of PrP<sup>C</sup> triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem* 2002; 83: 1208-1214.
27. Brown DR, Qin KF, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 1997; 390: 684-687.
28. Brown LR, Harris DA. Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem* 2003; 87: 353-363.
29. McKenzie D, Bartz J, Mirwald J, Olander D, Marsh R, Aiken J. Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by cooper. *J Biol Chem* 1998; 273: 25545-25547.
30. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of «nex variant» CJD. *Nature* 1996; 383: 685-690.
31. Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 1996; 274: 2079-2082.
32. Fraser H, Bruce ME, Chree A, McConnell I, Wells GA. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol* 1992; 73: 1891-1897.
33. Bruce M. Strain typing studies of scrapie and BSE. In: Baker H, Ridley RM, Totowa NJ (Eds.). *Prion diseases*, Humana Press, 1996; 223-236.
34. Bruce ME, Fraser H. Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 172: 125-138.
35. Somerville RA, Oberthür RC, Havekost U, MacDonald F, Taylor DM, Dickinson AG. Characterization of thermodynamic diversity between transmissible spongiform encephalopathy agent strains and its theoretical implications. *J Biol Chem* 2002; 277: 11084-11089.
36. Baron T, Crozet C, Biacabe AG, Philippe S, Verchere J, Bencsik A, Madec JY, Calavas D, Samarut J. Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol* 2004; 78(12): 6243-6251.
37. Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, nandan S, Lansbury Jr PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 1995; 375: 698-700.
38. Kuczius T, Haist I, Groschup MH. Molecular analysis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie strain variation. *The J Infect Dis* 1998; 178: 693-699.

39. Kuczius T, Groschup MH. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med* 1999; 5: 406-418.
40. Baron TGM, Biacabe AG. Molecular analysis of the abnormal prion protein during coinfection of mice by bovine spongiform encephalopathy and a scrapie agent. *J Virol* 2001; 75: 107-114.
41. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP<sup>Sc</sup> molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4: 1157-1165.
42. Peretz D, Williamson RA, Legname G, Matsunaga Y, Vergara J, Burton DR, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott MR. A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* 2002; 34: 921-932.
43. Baron T. Identification of inter-species transmission of prion strains. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 377-383.
44. Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, Goldmann W, Fraser H. Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol* Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921-925.
45. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that «new variant» CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389: 498-501.
46. Brown DA, Bruce ME, Fraser JR. Comparison of the neuropathological characteristics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29: 262-272.
47. Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3065-3070.
48. Béringue V, Bencsik A, Le Dur A, Reine F, Lan Lai T, Chenais N, Tilly G, Biacabé AG, Baron T, Vilotte JL, Laude H. Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog* 2006; 2(10): e112.
49. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* 1991; 128: 199-203.
50. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997; 389: 448-450; 526.
51. Brun A, Castilla J, Parra B, Rodríguez F, Torres JM. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las encefalopatías espongiformes transmisibles. *Rev Neurol* 2003 ; 37(7) : 648-653.
52. Büeler 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.
53. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 1994; 8: 121-127.
54. Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino A, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 1996; 379: 339-343.

55. Blättler T, Brander S, Raeber AJ, Klein MA, Voigtländer T, Weissmann C, Aguzzi A. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 1997; 389: 69-73.
56. Raeber AJ, Klein MA, Frigg R, Flechsigg E, Aguzzi A, Weissmann C. PrP-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *EMBO Journal* 1999; 18: 2702-2706.
57. Harris DA. Clathrin-coated vesicles and detergent-resistant rafts in prion biology. *Bull Inst Pasteur* 1998; 96: 207-210.
58. Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, Craven CJ, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 1999; 283: 1935-1937.
59. Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RR. N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol* 1991; 65: 6597-6603.
60. Ivanova L, Barmada S, Kummer T, Harris DA. Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2001; 276: 42409-42421.
61. Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *Embo J* 2002; 21: 1031-1040.
62. Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 1994; 370: 471-474.
63. Tompa P, Friedrich P. Prion proteins as memory molecules : an hypothesis *Neuroscience* 1998; 86: 1037-1043.
64. Prinz M, Montrasio F, Klein MA, Schwarz P, Priller J, Odermatt B, Pfeffer K, Aguzzi A. Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 919-924.
65. Bradley R. BSE transmission studies with particular reference to blood. *Dev Biol Stand* 1999; 99: 35-40.
66. Terry LA, Marsh S, Ryder SJ, Hawkins SA, Wells GA, Spencer YI. Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 2003; 152(13): 387-392.
67. Race R, Ernst D, Jenny A, Taylor W, Sutton D, Caughey B. Diagnostic implications of detection of proteinase K-resistant protein in spleen, lymph nodes, and brain of sheep. *Am J Vet Res* 1992; 53: 883-889.
68. Van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1228-1231.
69. Lasmezas CI, Cesbron JY, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Rioux R, Lemaire C, Lochet C, Dormont D. Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol* 1996; 70: 1292-1295.
70. Somerville RA, Birkett CR, Farquhar CF, Hunter N, Goldmann W, Dornan J, Grover D, Hennion RM, Percy C, Foster J, Jeffrey M. Immunodetection of PrP<sup>Sc</sup> in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *J Gen Virol* 1997; 78: 2389-2396.
71. Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, King A, Al-Sarraj S, Ironside JW, Lantos PL, Collinge J. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999; 353: 183-189.

72. Brown DR. Microglia and prion disease. *Microsc Res Tech* 2001; 54: 71-80.
73. McBride PA, Eikelenboom P, Kraal G, Fraser H, Bruce, ME. PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol* 1992; 168: 413-418.
74. Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabbott NA, Williams A, Fraser H, Morrison WI, Bruce ME. Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5: 1308-1312.
75. Bruce ME, Brown KL, Mabbott NA, Farquhar CF, Jeffrey M. Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol Today* 2000; 21: 442-446.
76. Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 2000; 288: 1257-1259.
77. Kosco-Vilbois MH. Are follicular dendritic cells really good for nothing?. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 764-769.
78. Yoshida K, van den Berg TK, Dijkstra CD. The functional state of follicular dendritic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of the lymphocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24: 464-468.
79. Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997; 390: 687-690.
80. Klein MA, Frigg R, Raeber AJ, Flechsig E, Hegyi I, Zinkernagel RM, Weissmann C, Aguzzi A. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 1998; 4: 1429-1433.
81. Prinz M, Huber G, Macpherson AJS, Heppner FL, Glatzel M, Eugster HP, Wagner N, Aguzzi A. Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol* 2003; 162(4): 1102-1111.
82. Béringue V, Demoy M, Lasmezaz CI, Gouritin B, Weingarten C, Deslys JP, Andreux JP, Couvreur P, Dormont D. Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol* 2000; 190: 495-502.
83. Beekes M, McBride PA. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* 2000; 278: 181-184.
84. Andreoletti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, van Keulen L, Schelcher F, Elsen JM, Lantier F. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 2000; 81: 3115-3126.
85. Sigurdson CJ, Williams ES, Miller MW, Spraker TR, O'Rourke KI, Hoover EA. Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *J Gen Virol* 1999; 80: 2757-2764.
86. Foster JD, Bruce M, McConnell I, Chree A, Fraser H. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet Rec* 1996; 138: 546-548.
87. Bons N, Lehmann S, Nishida N, Mestre-Frances N, Dormont D, Belli P, Delacourte A, Grassi J, Brown P. BSE infection of the small short-lived primate *Microcebus murinus*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III* 2002; 325 :67-74.
88. Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Preclinical test for prion diseases. *Nature* 1996; 381: 563.

89. Scott JR. Scrapie pathogenesis. *Br Med Bull* 1993; 49: 778-791.
90. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 2002; 83: 2897-2905.
91. Van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol* 2000; Suppl.: 57-71.
92. Race R, Oldstone M, Chesebro B. Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol* 2000; 74: 828-833.
93. Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* 2001; 31: 25-34.
94. Baldauf E, Meekes M, Diring H. Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol* 1997; 78: 1187-1197.
95. Maignien T, Lasmezas 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.
96. Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, Hauw JJ. BSE transmission to macaques. *Nature* 1996a; 381: 743-744.
97. Lasmezas CI, Fournier JG, Nouvel V, Boe H, Marcé D, Lamoury F, Kopp N, Hauw JJ, Ironside J, Bruce M, Dormont D, Deslys JP. 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.
98. Race R, Chesebro B. Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 1998; 392: 770.
99. Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J Virol* 2001; 75: 10106-10112.
100. Taylor D. Inactivation of the BSE agent. *C R Acad Sci III* 2002; 325: 75-76.
101. Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 2000; 356: 999-1000.
102. Will RG, Zeidler M, Stewart GE, Macleod MA, Ironside JW, Cousens SN, Mackenzie J, Estibeiro K, Green AJ, Knight RS. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2000; 47: 575-582.
103. Spencer MD, Knight RS, Will RG. First hundred cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease: retrospective case note review of early psychiatric and neurological features. *BMJ* 2002; 324: 1479-1482.