



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



## ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Introducción y Revisión Bibliográfica.....	3
2.1. Historia.....	4
2.2. Etiología.....	5
2.3. Patogenia y Transmisión.....	5
2.4. Epidemiología.....	6
2.5. Tratamiento y Prevención.....	7
2.6. Diagnóstico Laboratorial.....	7
2.7. Diagnóstico Diferencial.....	7
2.8. Otras tauopatías.....	11
2.8.1. Enfermedad de Alzheimer.....	11
2.8.2. Enfermedad de Parkinson.....	12
3. Justificación y objetivos.....	14
4. Material y metodología.....	15
4.1. Infraestructura.....	15
4.2. Muestras.....	15
4.3. Metodología.....	15
4.3.1. Selección de muestras.....	15
4.3.2. Corte histológico.....	16
4.3.3. Fijación en los portaobjetos y secado.....	16
4.3.4. Tinción de hematoxilina-eosina.....	16
4.3.5. Diagnóstico histopatológico.....	17
5. Resultados.....	18
5.1. Lesiones compatibles con Listeriosis.....	18
5.2. Fragilidad vascular.....	19
5.3. Otras lesiones no compatibles con IBNC.....	20
5.4. Muestras recomendadas para estudios adicionales de IBNC.....	20
6. Discusión.....	21
7. Conclusiones.....	25
8. Valoración personal.....	26
9. Bibliografía.....	27

## 1. RESUMEN

En los humanos, la mayoría de las demencias crónicas están asociadas a la hiperfosforilación y agregación generalizada intra y extracelular de una proteína asociada a microtúbulos denominada tau. De relevancia, cabe destacar la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y el Huntington, y otras menos frecuentes como la parálisis supranuclear, la demencia con granos argirófilos, la degeneración corticobasal y la demencia frontotemporal familiar. En los animales domésticos, las únicas enfermedades que podrían considerarse tauopatías son las lesiones detectadas en animales senescentes y en los afectados por enfermedades priónicas.

La cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo (Idiopathic Brainstem Neuronal Chromatolysis; IBNC) en bovinos adultos es una enfermedad que fue reconocida por primera vez en Reino Unido a consecuencia del análisis histopatológico masivo de animales en el curso de la crisis de la Encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

El objetivo del presente trabajo es el análisis retrospectivo de la médula oblongada a nivel del obex de bovinos recibidos en el Centro Nacional de Referencia de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, con el fin de evaluar la presencia de IBNC en animales sospechosos de padecer la EEB que fueron diagnosticados como negativos.

Para la metodología del trabajo, se han seleccionado todos aquellos animales sospechosos de padecer una EEB que fueron diagnosticados como negativos. Posteriormente se ha realizado el procesado histológico rutinario y tinción con hematoxilina y eosina para la evaluación de las lesiones típicas de esta enfermedad.

Los resultados encontrados en el presente trabajo reflejan que, de los 165 animales analizados, aproximadamente un 17% muestran lesiones compatibles con una Listeriosis; un 10% han mostrado fragilidad vascular; un 58% cursaron con sintomatología y lesiones inespecíficas, no atribuibles a ningún proceso concreto pero compatibles con procesos víricos de carácter leve; y finalmente, un 15% de las muestras analizadas reflejaron lesiones compatibles con procesos neurodegenerativos y similares a las descritas en la cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo. Estudios específicos de inmunohistoquímica y western blot serán realizados como continuación de este estudio con el fin de caracterizar la proteína tau y confirmar o descartar la presencia de la IBNC en nuestro país.

## **SUMMARY:**

In humans a major part of chronic dementias are associated with the hyperphosphorylation and widespread intra and extracellular aggregation of microtubule-associated protein tau. It is relevant to distinguish Alzheimer's, Parkinson's and Huntington diseases as well as less frequent ones like supranuclear palsy, argyrophilic grain dementia, corticobasal degeneration and familial frontotemporal dementia. In domestic animals the only diseases that could be considered as tauopathies are the lesions detected in senescent animals and those affected by prion diseases.

Idiopathic Brainstem Neuronal chromatolysis (IBNC) in adult cattle is a disease that was first recognized in the United Kingdom as a result of massive analysis of animals during the course of the bovine spongiform encephalopathy (BSE) crisis.

The objective of this study is the retrospective analysis of the medulla oblongata at the level of obex of bovines received at National Reference Center for Transmissible Spongiform Encephalopathies in order to evaluate the presence of IBNC in animals suspected of suffering BSE previously diagnosed as negative.

For the methodology of this work, all these animals suspected of suffering BSE and previously diagnosed as negative were selected. Thereafter the routine histological processing and hematoxylin-eosin staining, in order to evaluate the typical lesions of this disease, is going to be performed.

The findings of this study show that, of the 165 animals tested, approximately 17 % show injuries consistent with Listeriosis; 10% have shown vascular fragility; 58 % shown nonspecific symptoms and injuries, not attributable to any particular disease but compatible with mild viral processes; and finally, 15% of the samples shown lesions compatible with neurodegenerative processes similar to those described in neuronal idiopathic chromatolysis brainstem. Specific studies of immunohistochemistry and western blot analysis will be performed as a continuation of this study to characterize the P- tau and confirm or rule out the IBNC in our country.

## 2. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo (Idiopathic Brainstem Neuronal Chromatolysis; IBNC) en bovinos adultos es una enfermedad que fue reconocida por primera vez en Reino Unido a consecuencia del análisis masivo de animales en el curso de la crisis de la Encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Su primera descripción data de 1990 (Jeffrey *et al.*, 2015). Se trata de una patología de reciente aparición y ha adquirido especial relevancia como consecuencia de la similitud lesional que comparte con la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Tanto el cuadro clínico como las lesiones son compartidos en ambas enfermedades, de ahí que el objetivo fundamental de este trabajo sea el análisis retrospectivo de bovinos sospechosos de padecer la EEB que fueron diagnosticados como negativos con el fin de evaluar la presencia de IBNC en nuestro país.

### 2.1. Historia

La primera detección de la cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo (IBNC) fue en 1992 y estuvo muy ligada a la Encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Cuando en las décadas de los 80 y 90 se detectaron en Europa los primeros casos de EEB, un gran número de animales con sintomatología nerviosa, y por lo tanto sospechosos de padecer la enfermedad, se sacrificaron y se tomaron muestras del Sistema Nervioso Central (SNC) con el fin de confirmar su diagnóstico. En un primer momento todas las muestras se analizaron mediante las técnicas de confirmación de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), como son la histopatología y la inmunohistoquímica, y posteriormente mediante las denominadas técnicas de diagnóstico rápido (Badiola *et al.*, 2010).

Según la literatura, los primeros estudios no fueron capaces de diferenciar entre los casos de EEB y de IBNC al tratarse de dos patologías con ciertas similitudes lesionales y por la falta de pruebas laboratoriales suficientemente precisas como para poder diferenciarlas. Así, bajo ningún concepto se sospechaba que una nueva patología pudiera esconderse tras los casos de EEB (Jeffrey *et al.*, 2015). En los años posteriores creció el interés por las muestras cuyos primeros análisis habían dado resultados negativos a la EEB, pero sus lesiones histopatológicas resultaban muy parecidas. El avance tecnológico y el conocimiento sobre el origen de la encefalopatía espongiforme bovina permitieron diferenciar estas dos patologías, y diagnosticar por primera vez la IBNC como una nueva patología del sistema nervioso central en la especie bovina (Jeffrey *et al.*, 2008; Jeffrey *et al.*, 2015).

## 2.2: Etiología

El origen de la IBNC sigue siendo objeto de estudio y no está del todo clarificado. Se han realizado diversos estudios con el fin de demostrar si algunos virus (causantes de las enfermedades de Borna, Aujeszky, diarrea vírica bovina o Louping ill) o bien alteraciones metabólicas (deficiencias de vitaminas o minerales) pudieran estar relacionados con la etiología de la enfermedad. No obstante, todos los resultados han sido infructuosos y, a día de hoy, no hay pruebas concluyentes de su posible implicación (Jeffrey *et al.*, 2015). A nivel inmunohistoquímico, la detección de depósitos de proteína prión es un hallazgo común en los casos de IBNC, sin embargo, el patrón de depósito característico de esta enfermedad difiere sustancialmente del que se detecta normalmente en los casos de EEB clásica o en otras patologías priónicas del ganado vacuno (EEB atípica H y L). Finalmente, en los animales afectados se detectan niveles altos y amplia distribución de la forma hiperfosforilada de la proteína tau (P-tau; Jeffrey *et al.*, 2015).

Así, analizando todos los hallazgos encontrados, la combinación de la presencia de la P-tau y de la proteína prión junto con las lesiones neurodegenerativas observadas, parecían indicar que se trataba de la primera tauopatía en el mundo animal, de amplia distribución geográfica y de origen natural. A pesar de no disponer de información genética sobre el gen que codifica la proteína tau en los animales afectados, su presentación esporádica, su amplia distribución geográfica y la afección de varias razas bovinas se opone a la hipótesis de un posible origen hereditario de la patología. De esta forma, se trataría de la primera tauopatía esporádica, espontánea y de origen natural en especie bovina (Jeffrey *et al.*, 2015).

## 2.3. Patogenia y transmisión

La teoría que describe a la IBNC como la primera tauopatía espontánea, se basa en la detección de la forma fosforilada de la P-tau en todos los animales estudiados y además en íntima relación de la misma con las células de la glía, las dendritas y el pericarion neuronal. En todos los casos, la proteína no se asocia a neuronas cromatolíticas ni a axones degenerados, sino a la vacuolización existente en el tálamo, hipocampo y en la corteza cerebral (Jeffrey *et al.*, 2015). Tampoco se detectan ovillos neurofibrilares en todos los casos, hecho común a otras tauopatías como el Alzheimer, la enfermedad de Pick o la degeneración corticobasal (Frank *et al.*, 2008).

Ya se ha comentado su carácter esporádico, espontáneo y de origen natural, para lo cual se considera importante explicar las características esenciales de esta proteína:

- La proteína tau es una proteína que se encuentra de forma natural en el sistema nervioso de los mamíferos y cuya principal función es estabilizar la unión entre microtúbulos. Estas estructuras forman el citoesqueleto de las neuronas garantizando el correcto funcionamiento de procesos como la mitosis o el transporte sináptico de las neuronas (Frank *et al.*, 2008).
- La proteína tau presenta una fosforilación mínima en el SNC de animales (sobre 30-40 sitios). En algunas patologías humanas, como el Alzheimer, esta frecuencia puede ascender hasta 60, asociándose esta hiperfosforilación como un factor de riesgo a su padecimiento (Jeffrey *et al.*, 2015).
- Un estudio reciente defiende la existencia de una relación entre la cantidad de depósito de la proteína prión y la hiperfosforilación de la P-tau. En él se demuestra la presencia de la P-tau en relación con la proteína anómala PrP sin necesidad de formación de placas de amiloide (Reiniger *et al.*, 2011).
- La proteína tau es el componente principal de los ovillos neurofibrilares. Estos ovillos se encuentran en caso de disfunción de la P-tau y nos sirven como marcadores tempranos de procesos neurodegenerativos de patologías como Alzheimer, Síndrome de Down, Parkinson o enfermedad de Pick (Delacourte 2005).

#### 2.4. Epidemiología

Los datos epidemiológicos disponibles de la IBNC provienen casi exclusivamente de Escocia. A pesar de ello, nada hace pensar que en otros países la incidencia deba ser muy diferente. El gran volumen de animales testados en Escocia frente a la EEB, y el posterior estudio de los casos sospechosos reflejaron una incidencia media entre los años 1988 y 1991 de 7,16 vacunos de cebo y 2,68 vacas lecheras por cada 100,000 animales (6 años de media de edad y un rango entre 4-16 años). Durante el pico de la epidemia de la EEB (1992-1993) se confirmaron un total de 41 casos de IBNC. Es de destacar que, en porcentaje, el número de casos de IBNC entre los animales positivos a EEB fue del 0,7%, sin embargo ese porcentaje ascendió hasta el 12% cuando la búsqueda se realizaba entre los animales negativos (Jeffrey *et al.*, 2008; Jeffrey *et al.*, 2015).

A día de hoy, al tratarse de una patología poco conocida y sin mayor interés económico no se realiza un programa de seguimiento ni control financiados por la administración. De esta forma, resulta complejo conocer con exactitud la incidencia de la enfermedad en la cabaña bovina europea.

## 2.5. Tratamiento y Prevención

La cromatolisis idiopática del tronco de encéfalo es una patología relativamente nueva, de forma que aún no existen medidas de diagnóstico que permitan la detección precoz y eficaz en animales vivos. Por este mismo motivo no existen medidas ni terapéuticas, ni preventivas conocidas para esta enfermedad.

## 2.6. Diagnóstico Laboratorial

El diagnóstico de la cromatolisis idiopática del tronco del encéfalo sólo se puede realizar postmortem. Su diagnóstico clínico es muy complicado, caracterizado por alteración del comportamiento, disfagia y alteración de la marcha. Todas estas alteraciones son de carácter crónico y progresivo, y además, compatibles con gran cantidad de patologías del sistema nervioso central (Jeffrey *et al.*, 2015).

La confirmación definitiva se obtiene mediante la combinación de dos pruebas de laboratorio como son el examen histopatológico y la prueba de inmunohistoquímica. Con estas dos pruebas se busca encontrar las lesiones compatibles en el sistema nervioso central y detectar la presencia de la proteína prion en los tejidos afectados. Las lesiones histopatológicas que podemos observar se caracterizan por degeneración neuronal y axonal acompañados de inflamación no supurativa. Además podemos encontrar espongiosis de la sustancia gris del tálamo, del hipocampo, de la corteza cerebral y de los núcleos geniculados lateral y medial (Jeffrey *et al.*, 2015).

## 2.7. Diagnóstico diferencial

Dada la especial relevancia de la encefalopatía espongiforme bovina como enfermedad “tipo” a diferenciar con la IBNC, se hará una breve revisión de las características más relevantes de la misma.

### *Encefalopatía espongiforme bovina*

La lucha contra la EEB, solo en Inglaterra donde se acumuló casi el 97% de los casos detectados en Europa, supuso grandes pérdidas económicas tanto directas, al sacrificar más de 2 millones de animales sospechosos, como indirectas causadas por la pérdida de confianza y rechazo por parte del consumidor (OIE, 2015). A lo largo de los siguientes diez años, se propagó por todo el Reino Unido, expandiéndose por Europa y alcanzando gran relevancia internacional (Badiola *et al.*, 2010).

En el año 1987 se formuló la hipótesis que explicaría el origen de la EEB como

consecuencia del uso de las harinas de carne y hueso (HCH) procedentes de ganado ovino afectado por scrapie, endémico en Inglaterra, en la alimentación del ganado vacuno (Badiola *et al.*, 2010). La prohibición del uso de dichas harinas en la alimentación animal y las rigurosas medidas de diagnóstico, control y prevención, redujeron la incidencia de la EEB drásticamente, hasta alcanzar en la actualidad pocos casos esporádicos al año (MAGRAMA, 2013).

El agente causal de la EEB es una isoforma anómala ( $\text{PrP}^{\text{sc}}$ ) de una glicoproteína de membrana ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) que se encuentra en la mayoría de las células de los mamíferos y en especial en las neuronas (Badiola *et al.*, 2010). Mediante mecanismos, aún desconocidos, estas glicoproteínas en condiciones patológicas son capaces de cambiar su estructura convirtiéndose en las formas anómalas. A nivel estructural, en la  $\text{PrP}^{\text{sc}}$  abundan las láminas  $\beta$  tras el desplegamiento y posterior replegamiento de las hélices  $\alpha$ . Gracias a este cambio de conformación la  $\text{PrP}^{\text{sc}}$  adquiere la capacidad de autopropagarse, convirtiendo a la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en su homólogo anormal y aumentando así su resistencia a diversos procesos físicos (Riesner, 2003).

La principal vía de transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina es la vía oral, tras el consumo de harinas de carne y hueso contaminadas con priones. Tras la ingesta del material contaminado, es el propio sistema inmunitario del animal el que adquiere un papel fundamental en la diseminación de los priones. Uno de los principales puntos de entrada es el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) donde los priones son captados por las células M (enterocitos modificados) y le ayudan a llegar hasta las células macrofágicas y células dendríticas foliculares (CDF), donde se acumulan y multiplican. En este punto las proteínas anormales, tras un tiempo de espera variable, se dirigen al SNC directamente vía sistema nervioso periférico (SNP), o indirectamente a través del sistema linforreticular (nódulos linfáticos, bazo y amígdalas), siendo la segunda opción mucho menos frecuente en caso de EEB y más común en scrapie (Badiola *et al.*, 2010).

El diagnóstico de la EEB siempre comienza por la sospecha clínica. Así, los animales afectados por esta enfermedad presentan nerviosismo, temblores musculares e hipersensibilidad a los estímulos externos. Los cambios locomotores son otro signo clave en el diagnóstico clínico y se manifiestan con alteración de la marcha, sobre todo en el tercio posterior, que se agrava con el paso del tiempo. Todos estos signos tienen un carácter crónico y progresivo. No suele haber respuesta al tratamiento y la edad media de infección es de 42 meses de edad, siendo el periodo de incubación muy largo, pudiendo alcanzar entre 2 y 8 años (Badiola *et al.*, 2010).

Tras la comunicación de la sospecha y cumpliendo con la normativa comunitaria vigente, Reglamento (CE) 999/2001 que regula el Programa de Vigilancia de las EET, los

animales sospechosos de padecer una EET deben ser objeto de un examen histológico conforme a los métodos y protocolos oficiales. Si dicho examen no da un resultado concluyente se aplican técnicas alternativas como son la inmunohistoquímica, la inmunotransferencia o la observación de las fibrillas características mediante microscopía electrónica. Un hecho relevante en el diagnóstico, es el patrón de distribución de las lesiones ya que en el caso de la encefalopatía espongiforme bovina, este patrón permanece constante en todos los animales afectados. Las lesiones más relevantes y constantes en los animales afectados se caracterizan por:

- Vacuolización del neuropilo de la sustancia gris en los núcleos diana
- Vacuolización del pericarion neuronal en los núcleos diana
- Distribución simétrica y bilateral de las lesiones
- Astrocytosis, degeneración y perdida neuronal

Dichos núcleos o localizaciones diana son:

En médula oblongada

- Núcleo dorsal motor del nervio vago
- Tracto solitario
- Tracto espinal del nervio trigémino
- Formación reticular

En el puente:

- Núcleos vestibulares
- Formación reticular

En el mesencéfalo

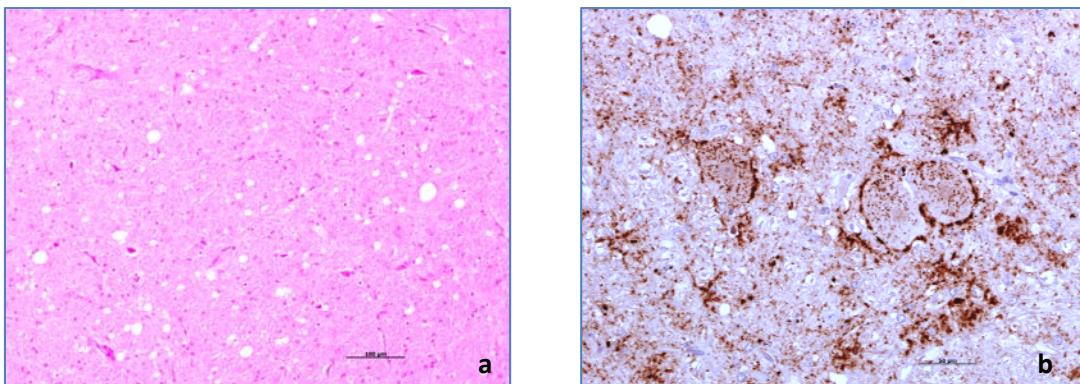
- Sustancia gris central
- Sustancia gris del colículo superior

Así mismo, también es posible detectar vacuolización del neuropilo de la sustancia gris en las áreas de tálamo e hipotálamo, corteza estriada y área septal (OIE, 2015).

Dado que no siempre es posible realizar el examen histológico, sobre todo si se trata de muestras congeladas, autolíticas, animales en estadios muy tempranos de la enfermedad o vacuolización insuficiente, las pruebas complementarias son de gran interés y utilidad. Todas ellas se basan en la detección de la PrP<sup>sc</sup> en los tejidos examinados.

La técnica de inmunohistoquímica (IHQ) permite la detección de la PrP<sup>sc</sup> mediante el uso de anticuerpos específicos. Su ventaja frente a otras técnicas consiste en su capacidad de mostrar la localización celular y topográfica de la PrP<sup>sc</sup>, muy útil a la hora de relacionarlo con las lesiones histopatológicas (ver figura 1). A día de hoy no existe un protocolo estandarizado

para la realización de la prueba, además de existir una gran variedad de anticuerpos a utilizar, entre los que destacan el L42 (R-Biopharm), F99 y F89 (USDA Pullman), R145 (Veterinary Agency laboratorios, Weybridge), SAF 84 (SPI bio) y 6H4 (Prionics) (OIE, 2015).



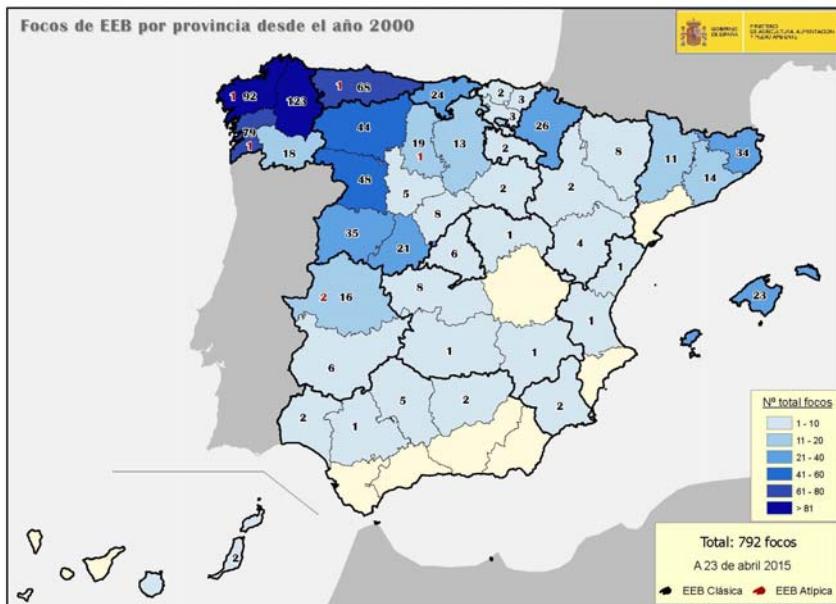
**Figura 1.** Vacuolización del neuropilo de la sustancia gris (a). 4X. Depósito de PrP<sup>sc</sup> detectado mediante la técnica de inmunohistoquímica (b). 20X

La PrP<sup>sc</sup> también es posible detectarla mediante la técnica de la inmunotransferencia o western blot. Esta técnica analítica consiste en la detección de proteínas específicas mediante una electroforesis en gel. En el diagnóstico de la EEB esta prueba se basa en el hecho de que la PrP<sup>sc</sup> es una glicoproteína con dos posiciones de glicosilación y por lo tanto posee diferentes patrones electroforéticos según se encuentre no glicosilada, monoglicosilada o diglicosilada (OIE, 2015).

Para conocer la epidemiología de esta enfermedad en España, a través del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente es posible recoger la información desde el año 2000 hasta la actualidad. A día de hoy se han detectado un total de 792 focos de EEB (ver figura 2), y desde el año 2003, se lleva observando en España una constante disminución de los casos (34,7% de disminución media de la incidencia anual), acompañada de un incremento de la media de edad de los animales afectados, demostrando la eficacia de las medidas de erradicación. En el año 2013 un total de 191.307 animales fueron sometidos a pruebas diagnósticas resultando todos ellos negativos a la EEB (MAGRAMA, 2013).

La prevención de la aparición de nuevos casos de la EEB en un futuro, está regulada a nivel europeo por el Reglamento 999/2001 del Parlamento Europeo. Este reglamento establece como principales medidas de prevención: la prohibición del uso de las proteínas procesadas de origen animal en la alimentación de otros animales; la monitorización basada en vigilancia activa (mediante pruebas diagnósticas de animales sin sospecha) y pasiva (análisis de animales sospechosos identificados por los veterinarios); y la retirada y posterior gestión del material específico de riesgo (MER). El MER son tejidos donde la acumulación del príón es

más probable, sobre todo partes del sistema nervioso central, medula espinal y tejidos linfoideos.



**Figura 2.** Número de focos de EEB acumulado por provincia y tipo desde el año 2000 hasta el año 2015. Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente a través de la Red de Alerta Sanitaria Veterinaria (RASVE).

## 2.8. Otras Tauopatías

### 2.8.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA), aunque no afecta directamente a la especie bovina ni a otros animales, es una de las tauopatías mejor estudiadas y de mayor interés en la medicina humana. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa, que afecta principalmente a personas de edad avanzada y cursa con una demencia progresiva. Solo en Europa se estima que su incidencia oscila entre 7-8 millones de personas, y debido al cambio demográfico y el aumento de la esperanza de vida que se observa en los países desarrollados, puede llegar a duplicarse antes del año 2050 (Jellinger, 2006). La Enfermedad de Alzheimer se consideró una entidad neuropatológica poco frecuente hasta mediados de 1960. Desde entonces, el número de personas que padecen la enfermedad se ha incrementado, siendo hoy en día reconocida como una de las enfermedades más comunes y con mayores coste económico de este siglo.

Determinar la causa de la enfermedad de Alzheimer es el objetivo principal de años de estudios y el esfuerzo de científicos de todo el mundo. Está claro que descubrir la causa sería

un gran paso en el acercamiento hacia una posible cura. A día de hoy existen 3 principales hipótesis que intentan explicar el daño neurodegenerativo que causa la demencia de los pacientes.

- 1) La hipótesis de la cascada de amiloide: postula que el péptido  $\beta$ -amiloide es el responsable de todo el daño cerebral que ocurre en un paciente con EA. Según esta teoría la acumulación del péptido provocaría la hiperfosforilación de la P-tau, la formación de ovillos neurofibrilares, la disfunción sináptica y la consecuente muerte neuronal. Hoy en día se cree que la cascada de amiloide no puede por sí sola explicar todos los cambios que sufre el tejido nervioso y que tiene que estar acompañada de otros factores (Simón *et al.*, 2010). La teoría de la hiperfosforilación de la P-tau, defiende la idea de que: la formación de los ovillos neurofibrilares (a causa de la agregación de la P-Tau) y la consecuente muerte neuronal, serían anteriores a la acumulación de las placas de amiloide (Gra *et al.*, 2002).
- 2) La teoría del glutamato: el glutamato es un neurotransmisor utilizado por las neuronas, especialmente por las grandes células piramidales que resultan ser las más vulnerables en la EA. En esta enfermedad el metabolismo energético se considera disminuido y al mismo tiempo, el deterioro metabólico causado por la edad aumenta este déficit. Estos dos procesos facilitan la activación de los receptores de glutamato y como consecuencia, la entrada de calcio en la célula, el inicio de mecanismos de citotoxicidad y la muerte neuronal (Gazulla & Cavero-Nagore, 2006).

De este modo, en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer interactúan activamente tres factores: el acumulo de la P-tau, las placas de amiloide Ab y la pérdida neuronal. Estos tres factores serán fundamentales a la hora de realizar el diagnóstico postmortem de la misma, caracterizado por pérdida neuronal; presencia de ovillos neurofibrilares; placas neuróticas de amiloide; angiopatía amiloide; y degeneración granulovacuolar.

### **2.8.2. Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad que afecta al sistema nervioso en el área responsable de coordinar la actividad, el tono muscular y los movimientos. Es el segundo trastorno neurológico más frecuente en el mundo, por detrás del Alzheimer. Se estima que cerca de 6,3 millones de personas padecen la EP, siendo el 90% de ellos mayores de 60 años. La edad media es de 60-65 años y suele afectar más a los hombres que mujeres

(NINDS, 2015; EPDA, 2015).

Las primeras descripciones de la EP se remontan al año 1000 A.C. en “El tratado clásico médico ayurveda” donde se hacía referencia a una enfermedad que se caracterizaba por escaso movimiento, exceso de saliva y somnolencia. Posteriormente se encuentran menciones parecidas en obras de Galeno de Pergamo (129-199 DC), Nicolas Tulp (1593-1674), Silvio de la Boe (1614-1672), Johannes Baptiste Sagar (1732-1813) y finalmente John Hunter considerado por muchos el verdadero padre de la enfermedad al sugerir a Parkinson la idea de recopilar los casos (García Ruiz, 2004).

La causa definitiva de la EP sigue siendo una incógnita. Se considera que es una patología multifactorial que combina factores genéticos y medioambientales. La forma familiar de EP es mucho menos frecuente que la esporádica. Su herencia genética sigue el modelo mendeliano y en ella se han hallado dos genes defectuosos que pueden seguir la transmisión autosómica dominante el gen (a-sinucleína/PARK1) o la forma recesiva (parkina/PARK2). En las formas no mendelianas de la enfermedad, que se presentan normalmente de forma esporádica, las causas se desconocen. Se consideran efecto de una combinación compleja de muchos factores genéticos y ambientales (Tapia-Núñez & Chaná-Cuevas, 2004).

La EP es una enfermedad crónica y progresiva causada por una lenta neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas. Su degeneración es la causa principal de la aparición de la sintomatología nerviosa que sufren los pacientes. Se estima que la aparición de los signos evidentes se corresponde con la pérdida superior al 80% de las neuronas (Tapia-Núñez & Chaná-Cuevas, 2004). La dopamina es uno de los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso central. Participa en la regulación de funciones como la conducta motora, la emotividad o la afectividad. Se sintetiza en el citoplasma de las terminales dopaminérgicas de las neuronas y se libera tras la llegada de un estímulo sináptico (Bahena Trujillo *et al.*, 2000).

El diagnóstico clínico de la EP parece sencillo al tratarse de una patología con sintomatología motora muy llamativa: temblores, rigidez, movimientos involuntarios o enlentecimiento de los mismos. No obstante en realidad tan solo el 25% de los casos diagnosticados de esta manera se confirman posteriormente mediante estudios anatomo-patológicos. Esto se debe al hecho de que varias patologías diferentes [Atrofia multisistémica (AMS), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de cuerpos de Lewy difusos (DLBD)], agrupadas bajo el nombre de “parkinsonismos atípicos” comparten esta sintomatología (Tapia-Núñez & Chaná-Cuevas, 2004).

En el diagnóstico histopatológico podemos encontrar alteraciones como la degeneración y pérdida neuronal, o la gliosis moderada. No obstante la lesión más característica es la presencia de los cuerpos de Lewy. Son unas inclusiones compuestas por neurofilamentos alterados que se pueden encontrar asociados a la excesiva perdida neuronal. La distribución de estas lesiones es muy amplia, pudiendo afectar a las neuronas de la sustancia negra, de los núcleos dorsales del nervio vago, de los núcleos basales de Meynert, del hipotálamo o incluso de la corteza cerebral. La distribución y la selección de poblaciones neuronales específicas convierten a los cuerpos de Lewy en marcadores definitivos de la degeneración neuronal y de la EP (Gibb & Lees, 1988).

### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo (Idiopathic Brainstem Neuronal Chromatolysis; IBNC) en bovinos adultos es una enfermedad que fue reconocida por primera vez en Reino Unido a consecuencia del análisis masivo de animales en el curso de la crisis de la Encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

El objetivo del presente trabajo es el análisis retrospectivo de la médula oblongada a nivel del obex de bovinos recibidos en el Centro Nacional de Referencia de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles con el fin de evaluar la presencia de IBNC en animales sospechosos de padecer la EEB que fueron diagnosticados como negativos.

Los objetivos específicos son:

- Investigar la presencia de la IBNC en la población bovina española.
- Realizar una descripción lesional de la cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo mediante su estudio histológico.
- Realizar un diagnóstico diferencial y descripción lesional de las enfermedades encontradas mediante histopatología.

## 4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### 4.1. Infraestructura

Este estudio se realizó en el Centro de investigación de encefalopatías y enfermedades transmisibles emergentes, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, como proyecto de fin de grado.

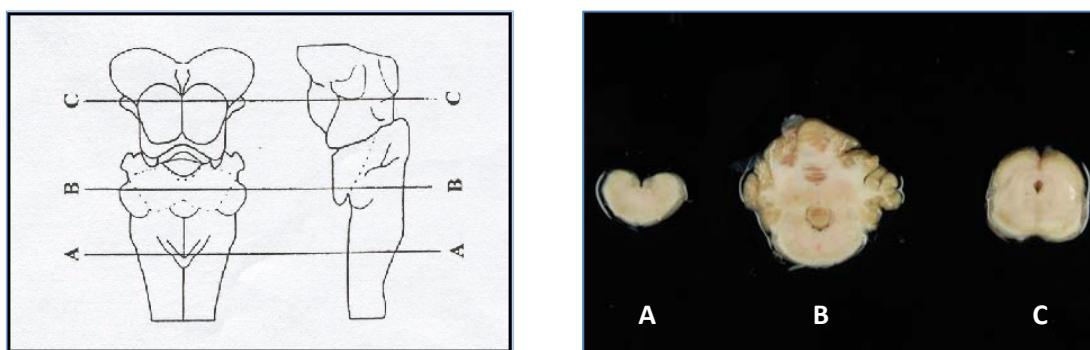
### 4.2. Muestras

Para realizar este estudio se ha trabajado con muestras procedentes del banco de tejidos del Centro de Investigación de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes. Todas ellas se encontraban conservadas en bloques de parafina y ningún animal fue sacrificado con el objetivo de realizar este trabajo. Las muestras analizadas son bloques de parafina a nivel de obex y se corresponden con animales sacrificados en el año 2000 como parte del programa nacional de vigilancia control y erradicación de la encefalopatía espongiforme bovina.

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1. Selección de las muestras

El primer paso en este trabajo consistió en seleccionar cuidadosamente las muestras adecuadas. Para ello se seleccionaron bloques de parafina a nivel de obex o en su defecto a nivel de puente (ver figura 3). Un total de 220 muestras fueron elegidas para su posterior corte y tinción.



**Figura 3.** Secciones examinadas para el diagnóstico de la EEB (OIE). A: Médula oblongada a nivel del obex. B: Médula oblongada al nivel de los pedúnculos cerebelosos (puente). C: Mesencéfalo.

#### **4.3.2. El corte histológico**

Tras su selección, las muestras fueron procesadas eliminando el exceso de parafina. Posteriormente con el fin de facilitar el corte, se conservaron en frío (-20°C durante 1 hora) y se colocaron sobre hielo fundido (10-15 min) justo antes de proceder al corte. El grosor elegido para este proceso fue de 4 micras y se realizó mediante un micrótomo manual.

#### **4.3.3. Fijación en los portaobjetos y secado**

Con la ayuda de un baño de María se fijaron las muestras cortadas en los portaobjetos individuales. Cada muestra se identificó indicando el código de procedencia y se trasladó en cubetas a la estufa (37°C durante 24h).

#### **4.3.4. Tinción de hematoxilina-eosina**

La tinción de hematoxilina-eosina se realizó según el Protocolo de técnicas de diagnóstico de la EEB y del Scrapie establecido por la OIE (OIE, 2015):

- Desparafinar y teñir los tejidos mediante la inmersión en los siguientes reactivos:
  - Xilol (1): 10 minutos
  - Xilol (2): 10 minutos
  - Alcohol 100º (1): 5 minutos
  - Alcohol 100º (2): 5 minutos
  - Alcohol 96º: 5 minutos
  - Alcohol 60º: 5 minutos
  - Agua corriente del grifo: 5 minutos
  - Hematoxilina: 15 minutos
  - Agua corriente del grifo: 5 minutos
  - Eosina: 30 segundos
  - Agua del grifo: 3 inmersiones de 1-2 segundos
- Deshidratar y montar los tejidos mediante la inmersión en los siguientes reactivos:
  - Alcohol 60º: 4 inmersiones de 1-2 segundos
  - Alcohol 96º: 4 inmersiones de 1-2 segundos
  - Alcohol 100º (1): 5 inmersiones de 1-2 segundos
  - Alcohol 100º (2): 3 inmersiones de 1-2 segundos
  - Xilol (1): 3 inmersiones de 1-2 segundos
  - Xilol (2): inmersión durante un mínimo de 1 minuto
  - Montar en el pegamento DPX

#### 4.3.5. Diagnóstico histopatológico

Una vez finalizada la tinción y tiempo necesario para el secado de las muestras, se procedió al estudio histopatológico de las mismas y posterior descripción y evaluación de los patrones lesionales observados, comparando los hallazgos con el historial clínico disponible.

Tras un examen inicial de las muestras, utilizando el objetivo de 10X, un total de 180 muestras, procedentes de 161 animales fueron seleccionadas para seguir con el estudio. La metodología del estudio histopatológico ha sido la siguiente:

- Observación inicial y valoración general de las lesiones halladas con objetivo de 5X.
- Observación detallada con el objetivo de 10X de las siguientes estructuras:
  - Corte a nivel de obex:
    - Núcleo dorsal motor del nervio vago
    - Núcleo del nervio hipoglosos
    - Tracto solitario
    - Tracto espinal del nervio trigémino
    - Formación reticular
    - Rafe medio
    - Núcleos de la oliva
    - Espacio submeníngeo
  - Corte a nivel de puente:
    - Núcleos vestibulares
    - Núcleo cerebelar central
    - Tracto espinal del nervio trigémino
    - Formación reticular
    - Rafe medio
    - Espacio submeníngeo
- Observación con mayor detalle de las mismas estructuras con objetivos de 20X y 40X.
- Anotación de los resultados.
- Toma de fotografía de algunas lesiones de mayor interés.

## 5. RESULTADOS

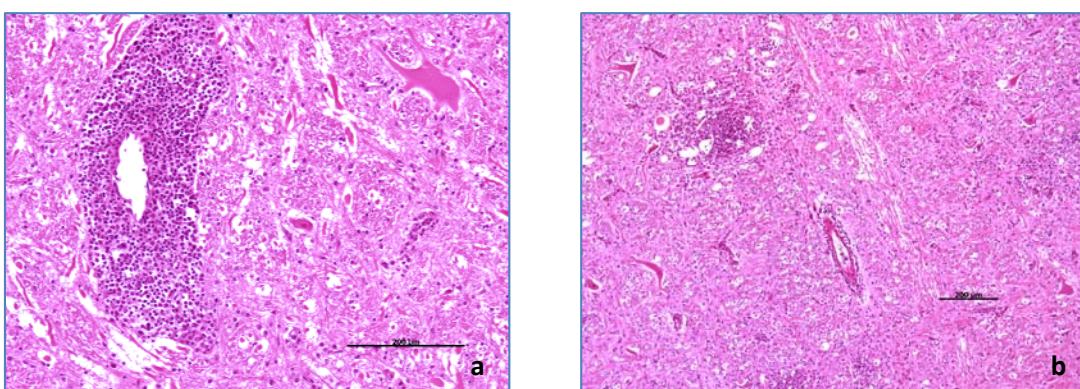
En el estudio histopatológico final se han analizado un total de 180 muestras procedentes de 161 animales cuyo historial clínico era compatible con sintomatología nerviosa pero negativos a la encefalopatía espongiforme bovina.

A continuación se procederá a reflejar las enfermedades diagnosticadas y las características histopatológicas más relevantes.

### 5.1. Lesiones compatible con Listeriosis

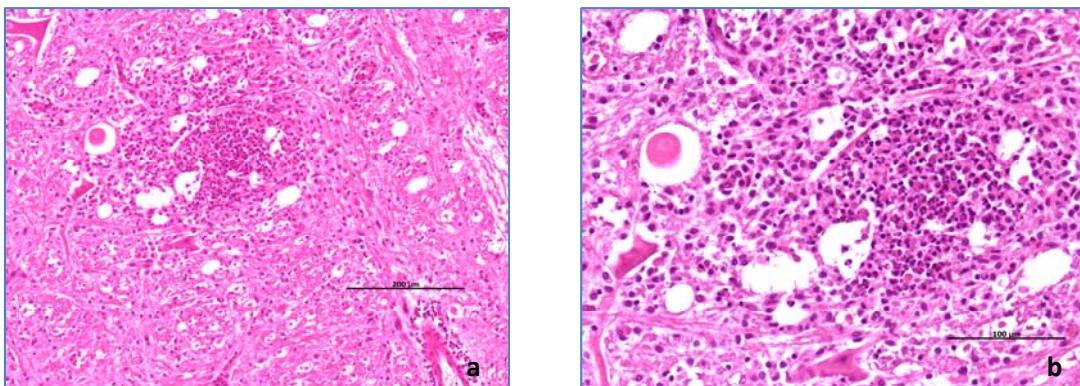
De los 161 animales estudiados, un total de 27 mostraban clara sintomatología nerviosa en la primera exploración clínica ante mortem. Los signos principales encontrados fueron: animales deprimidos e indiferentes al medio que los rodea; torneo con movimientos circulares hacia un lado y a otro del animal; pérdida de equilibrio; paresia de los músculos maseteros; parálisis unilateral del pabellón auditivo, párpados, labios y músculos de la lengua; ataxia progresiva, reclinación y muerte.

El estudio histopatológico del sistema nervioso central en todos estos casos ha reflejado lesiones compatibles con *Listeria* confirmado la sospecha clínica inicial. En el estudio histopatológico se apreciaron manguitos perivasculares de células inflamatorias mononucleares: linfocitos, monocitos y células plasmáticas y microabscesos con áreas de necrosis (ver figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Manguito perivascular linfoplasmocitario (a). 10X. Microabscesos y áreas de vacuolización y necrosis (b). 5X.

Dado que en todos los animales estudiados, las lesiones eran compatibles con una inflamación linfoplasmocitaria y necrosis del sistema nervioso central, los 27 animales fueron descartados para un estudio ulterior de la IBNC.

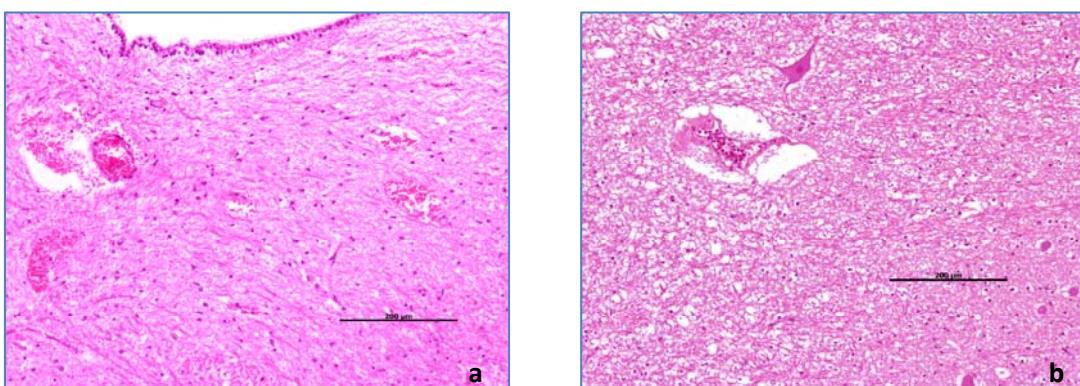


**Figura 5.** Microabscesos linfoplasmocitarios y neutrofílicos con áreas de necrosis, edema perineuronal y cromatolisis neuronal. (a) 10X. (b) 20X.

### 5.2. Fragilidad vascular

El historial clínico de 17 animales, distintos de los anteriores, se caracterizó por signos propios de un cuadro nervioso caracterizado por temblores, agresividad, incoordinación, caídas, torneo, parálisis y coma.

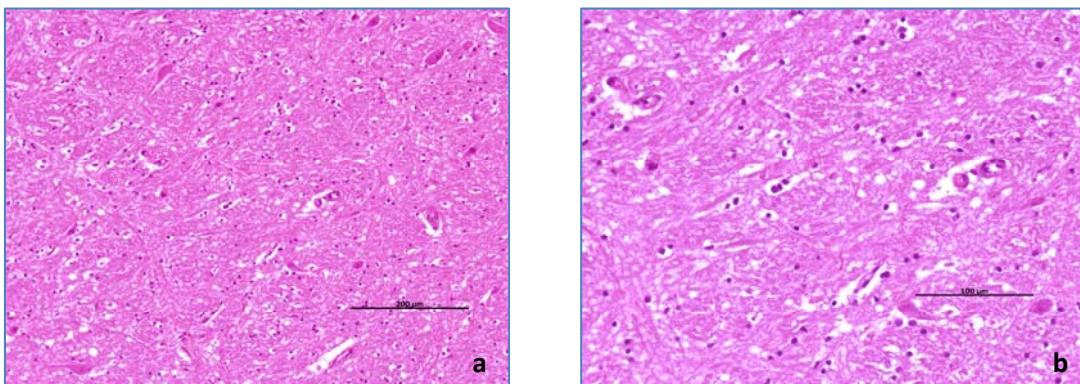
El estudio histopatológico reveló las siguientes lesiones a nivel encefálico: edema perineuronal, perivascular e hiperemia. En algunos casos marcada neutrofilia sanguínea y una fragilidad vascular generalizada con múltiples hemorragias (ver figuras 6 y 7). Dado que en todos los animales estudiados, las lesiones eran compatibles con fragilidad vascular probablemente asociada al daño causado por enterotoxinas, los 17 animales fueron descartados para un estudio ulterior de la IBNC.



**Figura 6.** Hemorragias perivasculares y daño del endotelio vascular. Hiperemia. (a) 10X. Neutrofilia sanguínea y edema perivascular (b) 20X.

### 5.3. Otras lesiones no compatibles con IBNC

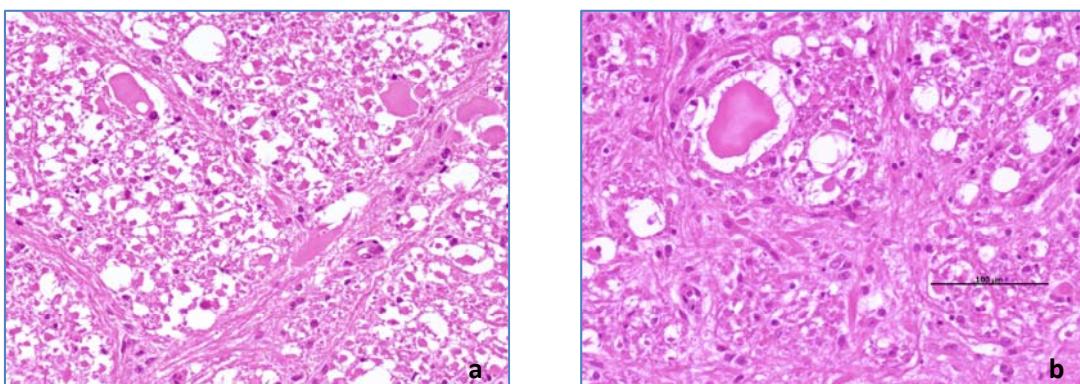
En 93 de los animales analizados, se han detectado lesiones compatibles con procesos víricos leves, lesiones inespecíficas y traumatismos. Las lesiones histopatológicas encontradas, compatibles en algunos casos con procesos víricos se han caracterizado por una encefalitis linfoplasmocitaria leve junto con focos de gliosis (ver figura 7). Otras lesiones inespecíficas han consistido en edema perivascular y perineuronal e hiperemia. Así mismo, en uno de los animales analizados, llamó la atención la presencia de células gigantes multinucleadas.



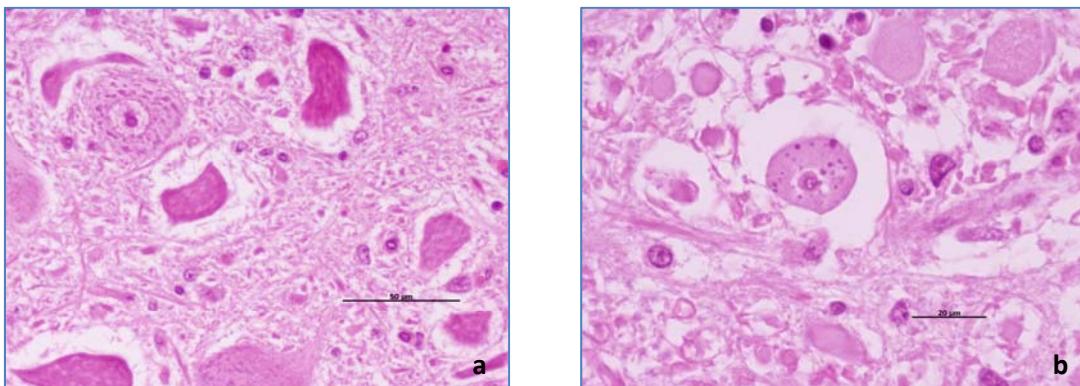
**Figura 7.** Gliosis generalizada en la sustancia gris del neuropilo (a) 10X. (b) 20X.

### 5.4. Muestras recomendadas para estudios adicionales de IBNC

De los 161 animales analizados, 24 de ellos presentaban un cuadro clínico de carácter nervioso cuyo estudio histopatológico no permitió definir lesiones concretas asociadas a procesos patológicos específicos, pero sí compatibles con la cromatolisis idiopática neuronal. Así, en estos animales, las lesiones encontradas han consistido en edema perineuronal y perivascular leve, picnosis neuronal, cromatolisis neuronal, demielinización, activación de grumos de Nissl y en algunos casos, principio de cariolisis (ver figuras 8 y 9).



**Figura 8.** Desmielinización generalizada de la sustancia blanca con especial afección de los axones neuronales. (a) 10X. (b) 20X.



**Figura 9.** Picnosis neuronal (a) 40X. Activación de los grumos de Nissl (b) 20X.

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en el presente trabajo reflejan que, de los 161 animales analizados, aproximadamente un 17% muestran lesiones compatibles con una Listeriosis; un 10% han mostrado fragilidad vascular, característica lesión que las endotoxinas bacterianas son capaces de producir en los endotelios; un 58% cursaron con sintomatología y lesiones inespecíficas, no atribuibles a ningún proceso concreto pero compatibles, en algunos casos, con procesos víricos de carácter leve; y finalmente, un 15% de las muestras analizadas reflejaron lesiones compatibles con procesos neurodegenerativos caracterizados por picnosis neuronal, cromatolisis, desmielinización y cariolisis de carácter leve.

Del análisis de estos datos cabe destacar que, una de las primeras consecuencias del análisis masivo de los bovinos adultos para la detección de EEB, a raíz del primer caso diagnosticado en el año 2000 (Badiola *et al.*, 2002), ha podido derivar en una subdetección de enfermedades de gran relevancia para la sanidad animal y para la salud pública como pueda ser la Listeriosis. Las pruebas de diagnóstico rápido aplicadas desde el año 2001 (Reglamento 999/2001) tuvo como consecuencia la desaparición del diagnóstico histopatológico, mostrando éste mayor especificidad para el diagnóstico de este tipo de patologías. Hoy en día los programas sanitarios se centran en enfermedades como la Brucelosis Bovina, la Lengua Azul, la Leucosis Enzoótica Bovina, la Perineumonia Contagiosa Bovina y la Tuberculosis Bovina (MAGRAMA, 2015), todas ellas de gran relevancia y diagnosticadas mediante métodos altamente sensibles de biología molecular, sin embargo, la información que aportaba un análisis individual de cada uno de los animales respecto a esta enfermedad concreta no está siendo sustituido por ningún procedimiento específico de vigilancia. La Listeriosis es una enfermedad de carácter zoonótico, y a día de hoy, en humana, la tasa de incidencia media en

España es de 0,56 casos por cada 100.000 habitantes mostrando una tendencia anual de carácter ascendente desde el año 2001 (Parrilla y Vaqué, 2014). Teniendo en cuenta estos datos y dado que los animales con sintomatología clínica de carácter neurológico siempre deberían ser analizados mediante pruebas histopatológicas (OIE, 2015), cabe especular que la subdetección de estos casos pueda ser debida a que sean catalogados en una subpoblación distinta a la de animales sospechosos y sean catalogados como sacrificios de urgencia, los cuales sí pueden ser analizados por técnicas rápidas de diagnóstico como el ELISA o el western blot.

De interés resultaría ahondar en aquellos animales que, mostrando signos clínicos de carácter nervioso, no forman parte de ningún programa de vigilancia vírico específico. Este sería el caso de los animales que muestran lesiones características de procesos víricos leves compatibles con enfermedades como Borna, diarrea vírica bovina o Aujeszky. En nuestro país no existen datos concretos de la prevalencia de estas enfermedades en la especie bovina, la información de la que se dispone se limita a estudios concretos de carácter individual, específicos de una determinada comunidad autónoma que no pueden ser extrapolables al resto del país (MAGRAMA, 2015). Cabe destacar que este grupo animales ha sido el más numeroso de todos los estudiados en este trabajo: más del 50% de animales han mostrado lesiones inespecíficas, no compatibles con una enfermedad concreta. Este hallazgo podría explicarse por la cantidad de enfermedades de carácter no infeccioso que también deben diferenciarse de la IBNC. Ejemplos concretos serían: procesos traumáticos (como fracturas vertebrales); enfermedades metabólicas (como la hipomagnesemia, la hipocalcemia, la cetosis nerviosa y la encefalopatía hepática); enfermedades tóxicas (como la intoxicación por plomo, intoxicación por organofosforados y varias intoxicaciones por plantas o micotoxinas); nutricionales (como la deficiencia de vitamina B y la deficiencia de cobre); o enfermedades degenerativas (como las enfermedades lisosomales, abiotrofias) (Badiola *et al.*, 2010).

En este estudio, un 10% de los animales estudiados han mostrado lesiones histopatológicas compatibles con fragilidad vascular posiblemente asociadas a la lesión endotelial generada por las endotoxinas producidas por algunos clostridios, como la toxina alfa. Esta toxina se caracteriza por la destrucción de células endoteliales de los capilares en todo el organismo del animal, y por tanto por la presencia de hemorragias generalizadas a nivel histopatológico (MAGRAMA, 2015).

Así mismo, en uno de los animales analizados, llamó especialmente la atención la presencia de células gigantes multinucleadas. Este tipo de reacción celular es un hallazgo que

se suele encontrar en los casos de tuberculosis bovina y en algunas micosis. El animal cuyo tejido nervioso se examinó, se sacrificó a los 39 meses de edad con la sospecha de sufrir proceso de listeria. Haber encontrado las células gigantes en este animal podría sugerir la posibilidad de un diagnóstico inicial erróneo. En este caso sería recomendable realizar una tinción de Ziehl Neelsen para la visualización de las micobacterias o bien cultivo celular en el caso de tener material congelado del mismo.

Finalmente, el 15% de los animales estudiados han reflejado lesiones similares a las descritas en los casos de IBNC en Escocia (Jeffrey *et al.*, 2015). Si comparamos este porcentaje con el descrito en el momento álgido de la epidemia en Reino Unido, los datos revelan que, en Escocia, el porcentaje de animales positivos a IBNC de entre los positivos a EEB fue del 0,7%, sin embargo el porcentaje de los hallados entre los animales con signos clínicos nerviosos, pero negativos a EEB fue del 12%. Estas cifras no se alejan de las encontradas en este trabajo y podrían sugerir la necesidad de profundizar en el estudio de esos casos para comprobar inmunoquímicamente su compatibilidad con la IBNC.

La IBNC es una enfermedad de carácter neurodegenerativo, progresiva y crónica, de presentación esporádica y estudiada, casi en exclusividad, en el Reino Unido (Jeffrey *et al.*, 2015). Los signos clínicos detectados en los animales que la padecen se caracterizan por cambios de comportamiento, aprehensión, problemas en la marcha, rigidez y pérdida de peso. Todos estos signos clínicos también son similares a los descritos en los animales aquí estudiados.

La IBNC se caracteriza por lesiones neurodegenerativas, presencia de depósitos de proteína prión (en diferente localización que en la EEB clásica o atípica) y presencia de P-tau asociada a las zonas de lesión. Dicha proteína, se ha detectado hiperfosforilida en algunas enfermedades humanas como el Alzheimer pero también en animales de edad avanzada clínicamente normales (Braak *et al.*, 1994). En las taupatías humanas, para tener una correcta clasificación de las mismas es necesario realizar un estudio de distribución de las lesiones, topografía de depósito de P-tau, características neurodegenerativas y comprobación del estado de fosforilación de la proteína mediante western blot (Jeffrey *et al.*, 2015). De esta forma, resultaría de gran interés la continuación del trabajo realizando, en un primer análisis, la detección de la P-tau mediante inmunohistoquímica en los 24 animales con lesiones neurodegenerativas compatibles. En estos casos, será necesario un futuro estudio retrospectivo para recuperar los encéfalos completos de los animales diana y revisar las zonas típicamente afectadas por la IBNC en búsqueda de lesiones compatibles. En caso de

encontrarlas se realizarán pruebas de inmunohistoquímica en las secciones de corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, tálamo, mesencéfalo, cerebelo y médula oblongada con anticuerpos específicos frente a la hiperfosforilación de P-tau, frente a proteínas amiloide de Alzheimer, frente a sinucleina parkinsoniana, frente a alfasinucleina y frente a la ubicuitina. En todos los casos en los que se conserve material fresco, se realizará en estos mismos tejidos la técnica de western blot para la detección de P-tau hiperfosforilada.

## 7. CONCLUSIONES

1. El análisis masivo de los bovinos adultos para la detección de EEB mediante técnicas de ELISA o western blot, ha podido derivar en una subdetección de enfermedades de gran relevancia para la sanidad animal y para la salud pública como pueda ser la Listeriosis.
2. El estudio histopatológico del sistema nervioso central permite clasificar las lesiones por procesos de carácter infeccioso, vascular, inespecífico y neurodegenerativo, permitiendo caracterizar las lesiones específicas de la cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo.
3. El análisis de animales con sintomatología clínica nerviosa pero negativos a EEB, ha reflejado que un 15% de los mismos tiene lesiones compatibles con la cromatolisis idiopática neuronal del tronco del encéfalo. Estos resultados son similares a los descritos en Escocia, siendo en ese caso de un 12%.

## CONCLUSIONS

1. The massive analysis of adult bovines for BSE detection by ELISA or western blot, could lead to a sub-detection of diseases of major importance for animal health and public health as may be listeriosis.
2. The histopathology study of the central nervous system allow to classify injuries such as infectious, vascular, nonspecific and neurodegenerative processes, allowing to characterize the lesions of the idiopathic brainstem neuronal chromatolysis entity.
3. The analysis of BSE negative animals, with nervous clinical signs, reflected that 15 % of them have injuries consistent with idiopathic brainstem neuronal chromatolysis. These results are similar to those described in Scotland, being in that case 12%.

## 8. VALORACIÓN PERSONAL

Realizar este trabajo supuso para mí un gran reto desde el primer día en el que entre crucé la puerta del Centro de investigación de enfermedades transmisibles emergentes por primera vez. No disponía de experiencia previa de trabajo laboratorial en un centro de tal nivel, y tampoco tenía muy claro si valgo para el mundo de la investigación. Decidí realizar un Trabajo de Fin de Grado con una parte práctica de investigación con el fin de averiguarlo.

Durante el desarrollo del trabajo pude comprobar cómo es el trabajo de un investigador, lo que conlleva dedicarse a este campo y cuáles son sus puntos fuertes y cuáles no.

Además este trabajo me permitió ampliar mis conocimientos como futuro profesional y como estudiante. Amplié mis conocimientos acerca de técnicas laboratoriales (preparación de las muestras, técnicas de tinción, estudio histopatológico), sobre la patología animal y su diagnóstico. Sin la menor duda siempre valoraré muy positivamente esta experiencia que acaba hoy aquí.

Finalmente, quería aprovechar esta posibilidad para agradecerle el apoyo, la paciencia y la dedicación que recibí de parte de todos los trabajadores del centro. Especialmente a los tutores de mi trabajo Dr. Juan Badiola por confiar en mí y ofrecerme esta oportunidad y la Dra. Cristina Acín que vigiló muy de cerca todo mi trabajo a lo largo de estos 9 meses. No me quiero olvidar de Sonia y Daniel que me ayudaron salir ilesa de mis primeros pasos por el laboratorio. A todos vosotros Gracias.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Badiola JJ, Monleón E, Monzón M, Acín C, Luján L, Fernández D, Simmons M, Vargas A. (2002). Description of the first cases of BSE in Spain. *Veterinary Record*, **151**: 509-510.
2. Badiola JJ & Pumarola i Batlle M. (2010). *Encefalopatías Espongiformes Transmisibles*. Ediciones Mayo. Madrid. ISBN: 978-84-9905-073-7.
3. Bahena-Trujillo R, Flores G & Arias-Montaña J. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, **11**: 39-60.
4. Braak H, Braak E & Strothjohann M. (1994). Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neuroscience letter*, **171**: 1-4.
5. Delacourte A. (2005). Tauopathies: recent insights into old diseases. *Folia Neuropathologica*, **43**: 244-57.
6. EPDA: European Parkinson's Disease Association. <http://www.epda.eu.com/en/> (fecha de consulta 20-11-2015).
7. Frank S, Clavaguera F & Tolnay M. (2008). Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*, **115**: 39-53.
8. García P. (2004). Prehistoria de la enfermedad de Parkinson. *Revista de Neurología*, **19**: 735-737.
9. Gazulla J & Cavero-Nagore M. (2006). Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología*, **42**:419-427.
10. Gibb W & Lees A. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **51**: 745-752.
11. Gra S, Padrón N & Llibre J. (2002). Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana Investigación Biomédica*, **21**: 253-261.
12. Jeffrey M, Perez BB, Martin S, Terry L & González L. (2008). Idiopathic Brainstem Neuronal Chromatolysis (IBNC): a novel prion protein related disorder of cattle? *BMC Veterinary Research*, **4**: 38.
13. Jeffrey M, Piccardo P, Ritchie D, Ironside J, Green A, McGovern G. (2015). A naturally occurring bovine Tauopathy is geographically widespread in the UK. *PLOS ONE*, **10**: 1-13.
14. Jellinger K. (2006). Alzheimer 100 – highlights in the history of Alzheimer research. *Journal of Neural Transmission*, **113**: 1603-1623.
15. MAGRAMA. (2013). Informe epidemiológico final sobre las encefalopatías

- espongiformes transmisibles en España. Madrid. <http://rasve.magrama.es> (fecha de consulta 20-11-2015).
16. MAGRAMA. (2015). Normativa y Programas sanitarios. <http://rasve.magrama.es> (fecha de consulta 20-11-2015).
  17. NINDS: National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2015). <http://www.ninds.nih.gov/index.htm> (fecha de consulta 20-11-2015).
  18. OIE: Organización Mundial de la Sanidad Animal. Técnicas de diagnóstico de la EEB y del scrapie establecidas por la Organización Internacional de Epizootías. <http://www.oie.int/es/> (fecha de consulta 20-11-2015).
  19. Parrilla F & Vaqué J. (2014). Estudio de la incidencia de listeriosis en España. *Gaceta Sanitaria*, 28.
  20. Reglamento (CE) n.º 999/2001 de la Comisión, del 22 de mayo de 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.
  21. Reiniger L, Lukic A, Linehan J, Rudge P, Collinge J, Mead S & Brandner S. (2011). Tau, prions and A $\beta$ : the triad of neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, 121: 5-20.
  22. Riesner D. (2003). Biochemistry and structure of PrP<sup>c</sup> and PrP<sup>sc</sup>. *British Medical Bulletin*, 66: 21-33.
  23. Simón A, Frechilla D, & Zambrana J. (2010). Perspectivas sobre la hipótesis de la cascada del amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Neurología*, 50: 667-675.
  24. Tapia-Nuñez J, & Chaná-Cuevas P. (2004). Diagnosis of Parkinson's disease. *Revista de Neurología*, 38: 61-67.