



Universidad Zaragoza

GRADO DE MEDICINA

DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA PrP^{sc} EN
EL GANGLIO DE GASSER

TRABAJO DE FÍN DE GRADO REALIZADO POR

RAQUEL MARTÍNEZ NAVARRO

DIRECCIÓN: EVA MONLEÓN MOSCARDÓ
Dpto. de Anatomía e Histología Humanas

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Facultad de Medicina

Curso 2014/2015

ÍNDICE

<u>RESUMEN: PALABRAS CLAVE</u>	1.
--------------------------------------	----

<u>ABSTRACT: KEYWORDS</u>	1.
---------------------------------	----

INTRODUCCIÓN

<u>ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES:</u>	3.
--	----

1. Prión: Proteinaceous infectious particles.....	3.
2. Clasificación de las EET.....	4.

SCRAPIE

1. <u>Historia</u>	7.
2. <u>Resistencia genética</u>	7.
3. <u>Patogenia</u>	8.
4. <u>Lesiones</u>	10.
5. <u>Clínica</u>	10.
6. <u>Diagnóstico</u>	11.

NERVIO Y GANGLIO TRIGÉMINO

1. <u>Nervio Trigémino</u>	12.
2. <u>Núcleo del trigémino</u>	12.
3. <u>Ganglio de Gasser</u>	13.
4. <u>Histología del ganglio del trigémino</u>	13.

<u>OBJETIVO</u>	15.
-----------------------	-----

MATERIAL Y MÉTODOS

1. <u>Muestras</u>	15.
2. <u>Inmunohistoquímica</u>	16.
3. <u>Evaluación del tejido</u>	17.

<u>RESULTADOS</u>	18.
-------------------------	-----

<u>DISCUSIÓN</u>	22.
------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	24.
---------------------------	-----

RESUMEN

El scrapie es una Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET) que afecta al ganado ovino. Las EET están causadas por una isoforma anómala (PrPsc) de una proteína celular normal (PrPc) llamada príon. La acumulación de la proteína priónica en el sistema nervioso central (SNC) es el sello de las EET. En el scrapie la PrPsc también puede acumularse en otros órganos, como los del sistema linfóide y el sistema nervioso periférico. El objetivo principal del presente trabajo es el estudio de la participación del ganglio del trigémino (GT) en la evolución de la enfermedad de scrapie. Para el estudio se analizaron muestras de médula oblongada, ganglio retrofaríngeo y GT procedentes de 14 ovejas infectadas de forma natural con scrapie. Las muestras se fijaron en formol y se procesaron para el examen histopatológico e inmunohistoquímico. En todos los animales se detectó la presencia de la PrPsc en todas las muestras analizadas. En el GT, la PrPsc se acumuló en las neuronas ganglionares (principalmente en las grandes de tipo A) y en las células satélites, pero en ningún caso se observó en las fibras nerviosas ni en el tejido conectivo del ganglio. Asimismo, se observó una vacuolización intraneuronal en 4 de las 14 muestras del GT. Los resultados del presente trabajo sugieren que en los animales afectados de scrapie la PrPsc se disemina desde el SNC hacia el ganglio del GT, con independencia del grado de diseminación de esta proteína en el sistema linfóide.

PALABRAS CLAVE

Encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), príon, scrapie, sistema nervioso periférico, ganglio trigémino, ganglio retrofaríngeo.

ABSTRACT

The scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) that affects sheep and goat cattle. The TSE is caused by an abnormal isoform of a normal cell protein (PrPc) named prion. The accumulation of the prionic protein in the central nervous system (CNS) is the main trait of TSE.

In the scrapie's case, the PrPsc can also form deposits in other organs aside of the CNS, like the lymphoid system and the peripheral nervous system. The goal of this paper is the study of the trigeminal ganglion (TG) participation in the illness' evolution. In order to pursue the study, we proceeded to do a systematic analysis of tissue samples from obex, retropharyngeal lymph node and TG from 14 naturally infected sheep. The samples were fixed in formol and processed for histological and immunohistochemical study. In all animals the PrPsc was detected in the samples. In the TG the PrPsc formed deposits in ganglion neurons (specially in type A) and in a satellite cells, but was never indentified in the nerve's fibres neither the lymph's connective tissue. Also, an intraneuronal vacuolization was observed in 4 of the 14

samples of the TG. The results of the present paper suggest that animals affected by the scrapie disease, the PrPsc spreads from the CNS to the TG, with no correlation of the spreading stage of this protein in the rest of the lymphoid system.

KEYWORDS

Transmissible spongiform encephalopathy (TSE), prion, scrapie, peripheral nervous system, trigeminal ganglion, retropharyngeal lymph node.

INTRODUCCIÓN

ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto al hombre como a diversas especies animales. Este grupo de enfermedades están causadas por un agente patógeno transmisible llamado prión.

1. Prión: *Proteinaceous infectious particles*

El prión fue descubierto por el profesor de Neurología y Bioquímica de la Universidad de California Stanley B. Prusiner, razón por la que obtuvo el premio Nobel de Medicina en 1997. El prion es una isoforma anómala (PrPres) de una proteína celular normal denominada PrP celular (PrPc). La proteína anómala produce cambios en la conformación de la PrPc modificándola, perdiendo ésta su función habitual y transformándola en una proteína patológica e infectiva que produce nuevas moléculas de PrPres. La PrPres también se denomina PrPsc debido a que los primeros estudios se hicieron sobre la enfermedad ovina de Scrapie [1].

La PrPc y la PrPres tienen una conformación tridimensional diferente. Como podemos observar en la imagen (Figura 1) la PrPc tiene una conformación tridimensional con un 40% de estructura de hélice alfa (aminoácidos del 23 al 121) y un 3% de hoja plegada beta (aminoácidos del 121 al 230). Además la zona plegada consta de 3 hélices enroscadas en forma de tirabuzón unidas (verde) y una pequeña hoja plegable (azul). La PrPsc tiene un 30% de hélice alfa y un 40 % de hoja plegada beta. Posee dos hélices enroscadas (verde) y tres hojas plegables (azul). Estas diferencias en la conformación le confieren a la PrPsc unas propiedades diferentes: presenta una gran resistencia a la inactivación con luz ultravioleta, a la radiación ionizante, a desinfectantes químicos y a tratamientos térmicos [2].

Asimismo, a diferencia de la PrPc, la PrPres únicamente es parcialmente digerida por proteasas (proteínasa K) dando lugar a un fragmento denominado PrP27-30, porque su tamaño es de 27-30 kD [3].

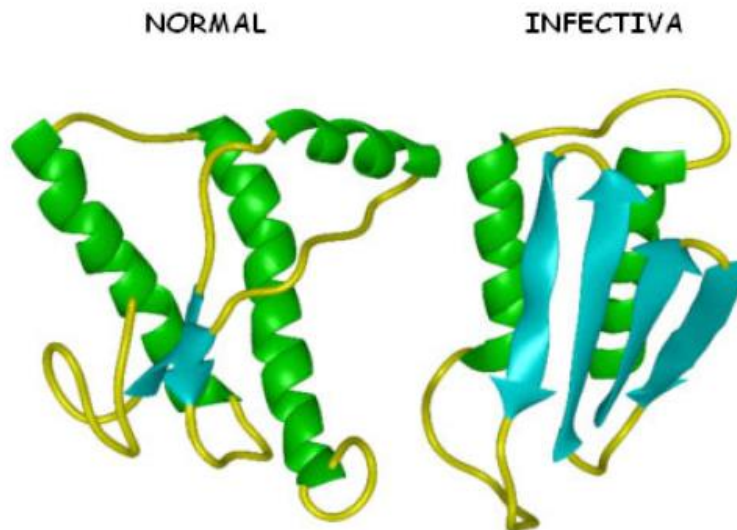


Figura 1: Estructura tridimensional de la proteína priónica, PrPc vs PrPsc.

Adaptado de: Registro Nacional de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles Humanas (RNEETH) [4].

Ambas proteínas tienen la misma secuencia de aminoácidos, aproximadamente 250 [2,3, 5, 6,7]. El gen que codifica para esta proteína llamado PRNP (16.000–22.000 bases), se ha identificado en un gran número de especies de mamíferos y está situado en el cromosoma 20, compuesto por 1 intrón de 10 kb separando dos o tres exones dependiendo la especie (uno de los cuales no se traduce) y una región codificante llamada ORF.

La PrPc en su mayor cantidad se encuentra situada en el sistema nervioso central (SNC), aunque también se puede encontrar en mucha menor cantidad en otros órganos como el corazón, y músculo esquelético, es decir, en tejido no nervioso [3].

2. Clasificación de las EET

Como hemos citado anteriormente, las EET pueden afectar tanto al hombre como a diferentes especies animales. Existen aproximadamente nueve tipos de EET humanas y siete tipos de EET animales, según la especie de animal afectada [3].

Las EET pueden clasificarse en tres categorías en función de su origen: esporádicas, hereditarias e infecciosas/adquiridas (Tabla 1) [3,8].

- Las EET esporádicas se producen por la conversión espontánea de la PrPc en PrPres, por causas desconocidas. En el hombre, las EET esporádicas son las más frecuentes.

En este grupo se encuentran la enfermedad de Cruetzfeldt–Jacob esporádica (eECJ) que supone el 85% de todas las EET humanas. La eECJ es una enfermedad poco frecuente (se dan aproximadamente 1–2 casos por millón de habitantes y año) y está distribuida por todo el mundo. La eECJ presenta un periodo largo de incubación, una evolución subaguda y muy mal pronóstico; se caracteriza por mioclonías,

demencias, signos piramidales, extrapiramidales y atáxicos, trastornos oculomotores, visuales y de la motoneurona inferior [5,10].

- Las EET hereditarias están asociadas a mutaciones en el gen PRNP que codifica para la proteína del prion. Aproximadamente un 10–15% de las EET humanas son hereditarias. En este grupo se encuentra el síndrome de Gerstmann–Straussler–Scheinker (GSS) y el insomnio familiar fatal (IFF) [4].

- Las EET infecciosas o adquiridas son aquellas que se producen por consumo de alimentos o sustancias contaminadas por el prion y aquellas de origen yatrogénico (operaciones quirúrgicas, transfusiones, trasplantes). En este grupo se incluyen algunas EET humanas, como la variante de la enfermedad de Creutzfeldt–Jakob (vECJ) y el kuru, y las EET animales, como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y el scrapie ovino y caprino [3].

Debido a su importancia por la transmisión a los seres humanos, explicaremos brevemente la EEB y la vECJ antes de centrarnos en el Scrapie.

La EEB es una EET que afecta al ganado bovino. Fue descrita por primera vez en 1986 en Reino Unido y dio lugar en este país a una epidemia durante el periodo 1989–92 en la que unas 200.000 vacas (principalmente lecheras adultas) murieron por la enfermedad y otras 4.500.000 asintomáticas fueron sacrificadas como medida de prevención epidemiológica. La enfermedad sobrepasó los límites geográficos del Reino Unido, se extendió por diferentes países de Europa y se convirtió en una enfermedad a nivel mundial, aunque no alcanzó en ningún otro país el grado de epidemia. Durante la epidemia los estudios epidemiológicos determinaron que la enfermedad se transmitía entre los bovinos por la alimentación con desechos animales procesados de bovinos u ovinos infectados con priones (alimentación del ganado vacuno con suplementos nutricionales a base de harinas obtenidas de desechos de carne y huesos de reses muertas y de otros animales de cría), ya que el prión es resistente a los procedimientos comerciales de desactivación.

La EEB, al igual que todas las EET, tiene un periodo de incubación largo y una sintomatología muy grave y de muy mal pronóstico. Las manifestaciones clínicas suelen aparecer entre los 5 o 6 años de edad y se caracteriza por cambios en la postura y conducta del animal, trastornos de sensibilidad y de la coordinación. La lesión característica de la EEB es la vacuolización del pericarion neuronal y del neuropilo, localizada principalmente en la médula oblongada (MO).

TABLA 1: Clasificación de las EET.

EET animales			
Enfermedad	Huésped	Etiología	Año de Descripción
Scrapie	Oveja. Cabra	Infección por priones de origen desconocido	1732
ETV	Visón	Infección por priones de ovejas o ganado	1947
ECC	Cérvido	Infección por priones de origen desconocido	1967
EEB	Ganado	Infección por priones de origen desconocido	1986
EUE	Nyala. Kudu	Infección por priones de origen EEB	1986
EEF	Gato	Infección por priones de origen EEB	1990
NHP	Lémur	Infección por priones de origen EEB	1996
EET humanas			
Enfermedad	Huésped	Etiología	Año de Descripción
Kuru	Humano	Infección por rituales de canibalismo	1900
sECJ	Humano	Conversión espontánea o mutación somática de PrPc a PrPsc	1920
fECJ	Humano	Mutación en PRNP	1924
GSS	Humano	Mutación en PRNP	1936
iECJ	Humano	Infección por priones de cadáveres humanos mediante injertos corneales, hGH o duramadre	1974
IFL	Humano	Haplotipo PRNP 178N-129M	1986
vECJ	Humano	Infección por priones de origen BSE	1996
sIFF	Humano	Conversión espontánea o mutación somática de PrPc a PrPsc	1999
VPSPr	Humano	Conversión espontánea o mutación somática de PrPc a PrPsc	2008

ETV (Encefalopatía transmisible del visón), ECC (enfermedad crónica caquetizante), EEB (encefalopatía espongiforme bovina), EUE (encefalopatía espongiforme de ungulados exóticos), EEF (encefalopatía espongiforme felina), NHP (encefalopatía espongiforme transmisible en primates no humanos), eECJ (enfermedad esporádica de Cruetzfeldt-Jacob), fECJ (enfermedad de Cruetzfeldt-Jacob familiar), iECJ (enfermedad de Cruetzfeldt-Jacob iatrogénica), vECJ (variante de la enfermedad de Cruetzfeldt-Jacob), GSS (síndrome de de Gerstmann-Straussler-Scheinker), IFF (insomnio familiar fatal), eIFI (insomnio familiar fatal esporádico), VPSPr (variante sensible de la proteasa priónica). REF [1]

La transmisión de esta enfermedad a los seres humanos originó la enfermedad actualmente conocida como variante de la Enfermedad de Creutzfeldt–Jakob [10, 11,12]. La vECJ fue descrita en 1996 y rápidamente se asoció al consumo de alimentos con priones bovinos. Esta enfermedad es la expresión de la EEB en humanos donde se produjo un “salto de la barrera inter–especie”. Se denominó variante de la ECJ porque presentaba síntomas y neuropatología algo diferentes a la ECJ esporádica. Es una enfermedad de inicio insidioso y de rápida evolución una vez aparecidos los primeros síntomas. Predomina en pacientes jóvenes y se caracteriza por cambios de conducta y ataxia. En España el control de esta enfermedad se inicia en 1995 y fue regulada en 2001 por el Centro Nacional de Epidemiología integrándose en la Red de Vigilancia Epidemiológica.

SCRAPIE

1. Historia



El scrapie ovino y caprino es la primera EET conocida y se ha utilizado frecuentemente como modelo de este grupo de enfermedades. La enfermedad fue descrita por primera vez en 1732 en Gran Bretaña y posteriormente en otros países de Europa occidental.

En 1936, diversas observaciones llevaron a los veterinarios franceses Cuillé y Chelle a concluir que el scrapie era una enfermedad infecciosa e inoculable, con un largo periodo de incubación y causada por un virus del SNC. Posteriormente, Pattinson (1965) demostró que el agente causal del scrapie era resistente a agentes físicos que solían inactivar los virus, como las altas temperaturas y el formaldehído, reconociendo la naturaleza atípica del patógeno y dando origen a una gran diversidad de hipótesis con el fin de explicar sus características y poniendo en duda la existencia de un ácido nucleico específico del patógeno. Finalmente, en 1982 Prusiner propuso la hipótesis del prión como una partícula proteica originaria del scrapie [1, 3, 10].

2. Resistencia genética

El gen PRNP ovino localizado en el cromosoma 13, está formado por 20.000 pb y codifica una proteína de 256 aminoácidos. Diversos poliformismos del gen PRNP ovino se han asociados con la susceptibilidad o resistencia al scrapie. El gen ancestral codifica los aminoácidos alanina (A), arginina (R) y glutamina (Q) en los codones 136, 154 y 171 (haplotipo ARQ). Los polimorfismos en los codones 136 (sustitución de A por valina (V)), 154 (R por histidina (H)) y 171 (sustitución de Q por R o H) son los más frecuentes. Esta variabilidad da lugar a cinco haplotipos (ARQ, VRQ, AHQ, ARR y ARH) que se combinan entre sí para dar 15 genotipos. Estos genotipos se pueden clasificar en cinco grupos (R1– R5) de acuerdo con la susceptibilidad que confieren a la enfermedad [1,3, 15] (Tabla 2).

TABLA 2: Clasificación de los grupos de riesgo de susceptibilidad genética al Scrapie.

Resistencia Genética		Genotipo	Categoría de Riesgo		Susceptibilidad Genética
		ARR/ARR	RIESGO 1		
		ARR/AHQ	RIESGO 2		
		AHQ/AHQ			
		ARR/ARQ	RIESGO 3		
		ARR/ARH			
		ARQ/AHQ			
		AHQ/ARH			
		ARH/ARH	RIESGO 4		
		ARQ/ARH			
ARQ/ARQ					
ARR/VRQ					
AHQ/VRQ					
ARQ/VRQ	RIESGO 5				
ARH/VRQ					
VRQ/VRQ					

Clasificación de los cinco grupos de riesgo (Riesgo 1–5) según la susceptibilidad en función de los diferentes tipos de genotipos. Representando con una flecha ascendente el nivel de resistencia genética y con una descendente la susceptibilidad a la enfermedad.

El haplotipo ARR confiere resistencia frente a la enfermedad mientras que el VRQ es el más susceptible, por lo tanto, los genotipos VRQ / VRQ, VRQ / ARQ, VRQ / ARH y VRQ / AHQ (riesgo 5), son los más propensos a desarrollar la enfermedad. El haplotipo ARQ, el más común en las razas ovinas españolas, tienen una susceptibilidad media al Scrapie [1, 3].

Recientes estudios han demostrado la existencia de un Scrapie llamado “atípico”, con características diferentes a las citadas anteriormente (clínica, genética, patogenia) como consecuencia de aparición de nuevas cepas diferentes a las ya conocidas [3].

3. Patogenia

La principal vía de entrada del prión es la digestiva, a través de la ingesta de alimentos o sustancias contaminadas. Los estudios han demostrado que el prión se asocia al sistema nervioso entérico y al tejido linfoide intestinal (GALT), concretamente a la zona del ileón y del yeyuno caudal, situándose en las placas de Peyer, donde se pone en contacto con las células foliculares dendríticas (CFD) para acumularse y replicarse. Actualmente no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales los priones del intestino pasan a invadir el SNC. Diversos estudios han revelado que los priones tienen dos vías de diseminación hacia el SNC (neuro-invasión):

- Una vía directa a través del sistema nervioso periférico (SNP). En esta vía, se han demostrado dos circuitos de neuroinvasión de los priones: el circuito del nervio esplácnico (el complejo mesentérico–ganglio celiaco, núcleo intermediolateral de la sustancia gris de la médula espinal torácica y ganglios de la raíz dorsal) y el circuito del nervio vago (núcleo motor

dorsal del vago, núcleo del tracto solitario y ganglios nodosos). Así, la propagación al SNC se produce en dirección ascendente (centrífuga) a lo largo de las fibras nerviosas del nervio vago y los nervios espláncnicos innervando respectivamente el núcleo dorsal motor del nervio vago y la sustancia gris de la médula espinal torácica (Figura 2).

– Una vía indirecta formada por el sistema linforreticular (SLR) junto al SNP. En este caso, el prión pasa desde las placas de Peyer a los ganglios linfáticos mesentéricos y posteriormente a otros órganos linfoides incluyendo al bazo y los ganglios linfáticos submaxilares y retrofaríngeos [2, 3, 7, 8, 10,16, 17].

Una vez en el SNC, a nivel de la médula espinal torácica y la MO del SNC, la infección se puede propagar por la sustancia gris de la médula espinal y el encéfalo en todas las direcciones.

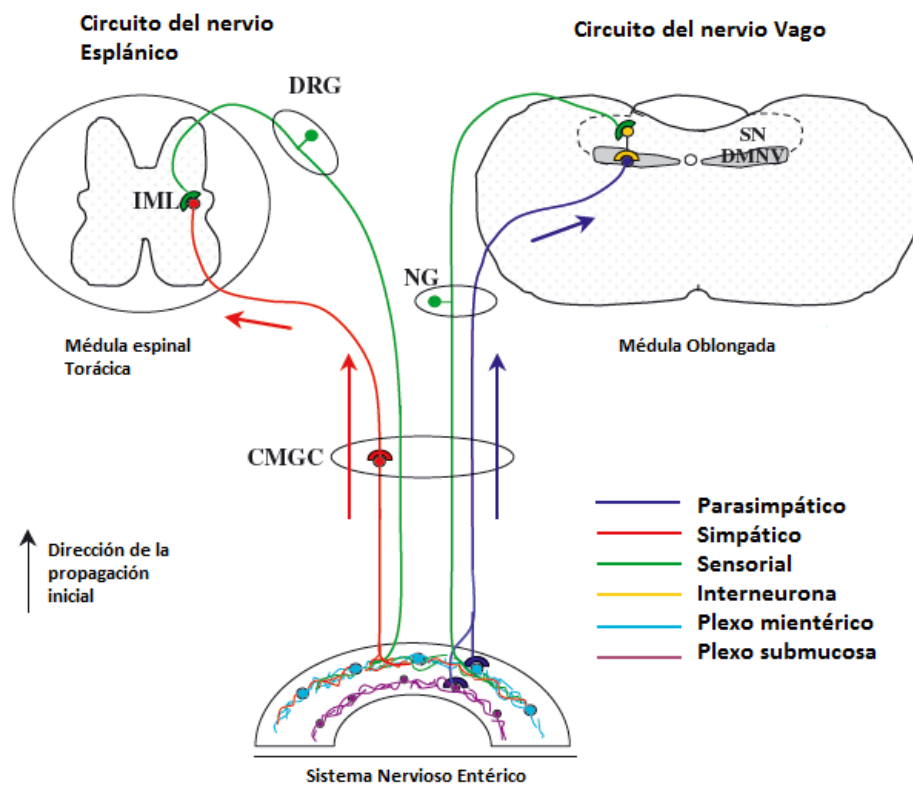


Figura 2: Representación de los dos circuitos de infección de los priones.

CMGC (complejo mesentérico–ganglio celíaco), DMNV, (núcleo dorsal motor del nervio vago), DRG(ganglio de la raíz dorsal), IML (columna o núcleo intermediolateral), NG (ganglio nodoso) ,SN (núcleo del tracto solitario). Representación de los dos circuitos, el circuito del nervio esplácnico y el circuito del nervio vago del SNP. Tomando como origen el sistema nervioso entérico, el prión accede al SNC por las fibras simpáticas hacia la médula espinal torácica y por las fibras parasimpáticas hacia la medula oblongada [12].

4. Lesiones

Las lesiones de las EET son siempre microscópicas y solo se han descrito en el SNC. La lesión característica es la vacuolización del neuropilo de la sustancia gris (cambio espongiiforme) y del pericarion neuronal (una única vacuola o múltiples, bien delimitadas, que pueden dilatar el soma neuronal).

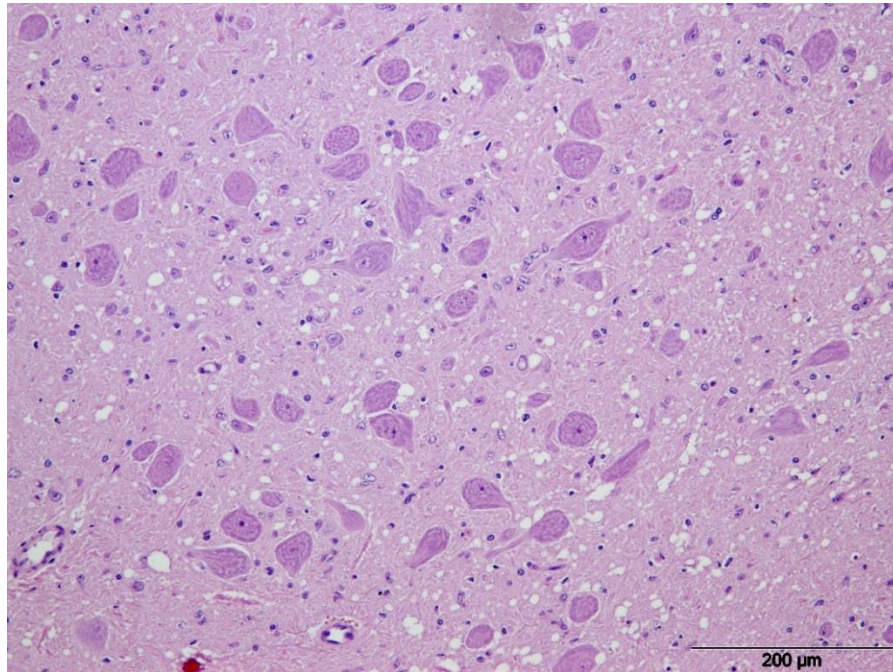


Figura 3: Tinción HyE de la médula oblongada. Vacuolización del neuropilo del núcleo dorsal del vago de una oveja afectada por scrapie.

En el scrapie, el cambio espongiiforme se inicia (y es más intenso) en la MO, concretamente en el núcleo dorsal del vago, el tracto solitario, el núcleo del hipogloso, la formación reticular y el tracto espinal del trigémino. Otras localizaciones que frecuentemente se ven afectadas son la médula espinal, el cerebelo, en la el mesencéfalo, ciertos núcleos del tálamo y el núcleo accumbens del área frontal. En los casos avanzados de la enfermedad, los cambios espongiiformes se pueden detectar en prácticamente todas las áreas del SNC. Otras lesiones que se pueden observar en el scrapie son degeneración y pérdida neuronal, astrocitosis (en las zonas en las que se observa la vacuolización) y amiloidosis [7, 16].

5. Clínica

La sintomatología del scrapie se presenta en animales adultos de 2 a 5 años de edad. Los síntomas dependen de la región cerebral afectada. Generalmente se inicia con cambios en el comportamiento. Otros signos que se pueden observar cuando la enfermedad progresa son la pérdida de coordinación (ataxia cerebelar), un rascado violento, la excesiva ingesta de líquido (polidipsia), la pérdida de visión, pérdida de peso e irregularidades en el movimiento junto a temblores (tremor) y convulsiones. La enfermedad

tiene un desarrollo lento, las ovejas pueden vivir entre 1 y 6 meses tras la aparición de los primeros síntomas clínicos pero la muerte es inevitable [1, 3, 10].

6. Diagnóstico

El diagnóstico del scrapie se basa en el examen histopatológico de SNC, para la observación de las lesiones características asociadas a la enfermedad, y en la detección de la proteína patológica PrPsc, mediante diversas técnicas como la inmunohistoquímica (IHQ).

En cuanto la histopatología, el diagnóstico positivo se basa en la observación de la vacuolización del pericarion neuronal y del neuropilo de la sustancia gris en núcleos diana (cambio espongiforme, con una distribución generalmente simétrica y bilateral). El diagnóstico negativo se basa en la ausencia de vacuolización en núcleos diana aunque pueden existir diagnósticos erróneos o no concluyentes cuando el material no presenta las condiciones adecuadas (autólisis, congelación y vacuolización insuficiente del neuropilo de las neuronas).

La técnica IHQ para la detección de la PrPsc se basa en la detección de la PrP en cortes histológicos mediante la utilización de anticuerpos frente a la proteína patológica. Esta técnica permite observar su localización topográfica, el tipo de depósito y su relación con las lesiones histológicas. El diagnóstico positivo se basa en la observación de los cúmulos de la proteína siguiendo un patrón característico de inmunotinción. En el SNC se han descrito los siguientes patrones de inmunotinción: intraneuronal, perineuronal, axonal, tinción del neuropilo, glial, perivascular, subependimal y placas de amiloide.

En el scrapie, se puede detectar la PrPsc en diversos tejidos, principalmente en los del sistema linforeticular, donde la tinción se restringe al interior de los folículos, localizándose depósitos de PrPsc en macrófagos y en células dendríticas foliculares. También puede observarse una inmunotinción inespecífica que no sigue el patrón característico de la PrPsc, por autólisis de la muestra, “efecto borde” o reacción cruzada del anticuerpo con otros antígenos. El diagnóstico negativo se basa en la ausencia de inmunotinción específica en la muestra [18].

NERVIO Y GANGLIO DEL TRIGÉMINO

1. Nervio Trigémino

El nervio trigémino también conocido como el quinto par craneal o V par, es el más grande de los nervios craneales. El nervio corresponde al primer arco branquial y es un nervio craneal mixto, ya que es responsable de la sensación en la cara y de algunas funciones motoras tales como morder y masticar.

El nombre deriva del hecho de que ambos nervios trigéminos, uno a cada lado de la protuberancia, tienen tres ramas principales: el nervio oftálmico, el nervio maxilar, y el nervio mandibular (Figura 4). Los nervios oftálmicos y maxilares son puramente sensoriales y el nervio mandibular es mixto, tiene dos funciones la sensorial y la motora. La división del motor del nervio trigémino deriva de la placa basal de la protuberancia embrionaria, mientras que la división sensorial se origina a partir de la cresta neural craneal.

- El nervio Oftálmico, acompañado en todo su recorrido por las fibras parasimpáticas que inervan la glándula del lagrimal, inerva el globo ocular, la piel del párpado superior, la frente, el dorso de la nariz y las mucosas de las cavidades nasales y senos paranasales.

- En nervio Maxilar inerva la piel de la región temporal anterior y de los pómulos, así como la piel bajo el globo ocular. Sensitivamente inerva el paladar, los dientes superiores y sus encías, así como la mucosa del seno maxilar.

- El nervio Mandibular contiene fibras parasimpáticas para las glándulas salivales mayores y fibras gustativas para la lengua. Inerva los músculos masticadores, el musculo milohioideo, y parte del músculo digástrico, así como el músculo tensor del velo del paladar y tensor del tímpano [19].

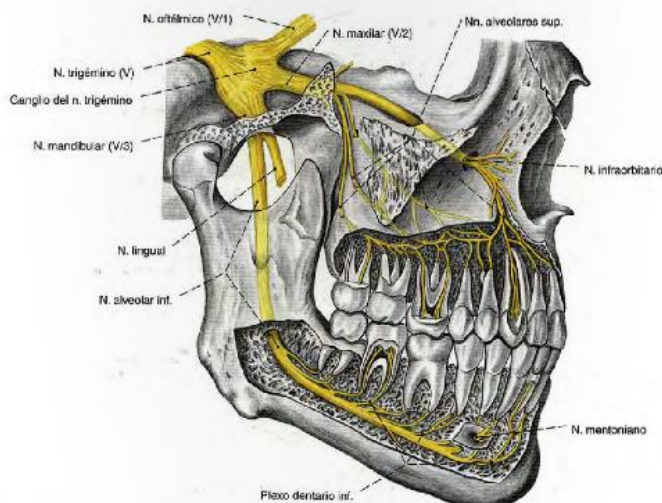


Figura 4: Nervio Trigémino y ramas. Visión lateral del Ganglio y del nervio Trigémino (V) y sus ramas el nervio oftálmico (V/1), el n.maxilar (V/2), y el n.mandibular (V/3) [19].

2. Núcleo del trigémino

El núcleo del trigémino se extiende a lo largo de todo el tronco cerebral,

desde el cerebro medio a la médula, y continúa en la médula cervical, donde se combina con las células del asta dorsal de la médula espinal. El núcleo se divide anatómicamente en cuatro partes: el núcleo mesencefálico del nervio trigémino (somatosensitivo), el núcleo pontino del nervio trigémino (sensitivo principal), el núcleo espinal del nervio trigémino (aferente somático general, ASG) y el núcleo motor del nervio trigémino (eferente visceral especial, EVE) [20].

3. Ganglio del trigémino o de Gasser

El nervio trigémino, como una raíz sensitiva grande y una raíz motora pequeña, sale del puente y discurre a través del borde superior de la porción petrosa del temporal hacia la caverna trigeminal o caverna de Meckle donde se encuentra ganglio semilunar del trigémino llamado ganglio de Gasser.

El ganglio de Gasser situado en la cara anterior del peñasco es la zona de división del nervio en sus tres ramos principales, oftálmico V1, maxilar V2 y mandibular V3. Está compuesto por neuronas pseudomonopolares que conducen sensibilidades protopáticas y epicrítica a los núcleos pontino y espinal del nervio trigémino.

Histología del ganglio del trigémino

Las poblaciones celulares del ganglio son las neuronas ganglionares con sus fibras nerviosas, las células satélites, las células de Schwann y los fibroblastos,

El ganglio de Gasser está rodeado por una cápsula de tejido conectivo que se continúa con el perineuro y el epineuro de los nervios periféricos adyacentes. Esta cápsula emite trabéculas hacia el interior del ganglio y forma una estroma muy vascularizado que junto a haces de fibras nerviosas divide los cuerpos celulares nerviosos en grupos de distintos tamaños. Los fibroblastos producen las fibras de colágena y la matriz extracelular del tejido conjuntivo ganglionar.

Cada neurona ganglionar se encuentra rodeada por una capa de células gliales aplanadas llamadas células satélite, las cuales están separadas del tejido conectivo circundante por una lámina externa. Estas células están muy relacionadas con las células de Schwann, ya que en ciertas condiciones pueden adquirir su morfología y realizar las mismas funciones. Las células de Schwann son la glia del sistema nervioso periférico, envuelven a varios axones con su citoplasma, en el caso de fibras no mielínicas, y a un solo axón en el caso de fibras mielínicas [20, 21, 22].

Las neuronas del ganglio del trigémino son de tipo aferente sensitivas (pseudomonopolares) es decir, transmiten la información desde la periferia al SNC, y se encuentran divididas en varios grupos en función de su morfología, su función y sus características bioquímicas. Según su

morfología encontramos dos tipos de neuronas, las neuronas tipo A (grandes y claras) y las neuronas tipo B (pequeñas y oscuras; Figura 5). La diferencia entre ambas se basa en la apariencia de la sustancia de Nissl (SN), compuesta por cúmulos del retículo endoplasmático rugoso. En las tipo A los cúmulos de SN se encuentran en la periferia del pericarion separados por neuroplasma, y en las de tipo B se encuentran compactos y sin separaciones citoplasmáticas. Otra diferencia es que las neuronas tipo A, tiene fibras nerviosas mielínicas y las pequeñas tipo B fibras amielínicas. Diferentes estudios comentan la existencia de un tercer grupo de neuronas tipo C, compuesto por las neuronas más pequeñas que componen el ganglio. Junto con las intermedias componen la población mayoritaria del ganglio debido a que las neuronas Tipo A (grandes) detienen su desarrollo antes. Por lo tanto, morfológicamente existen 3 tipos de neuronas (A, B, C) grandes, intermedias y pequeñas en proporciones variables según la especie y la edad y condiciones del estudio.

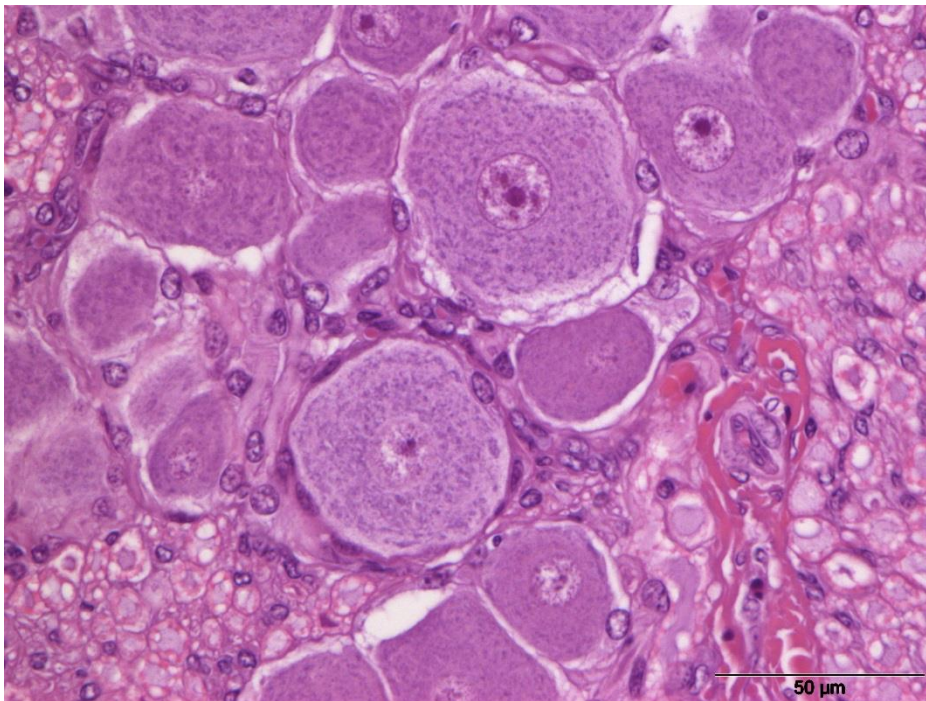


Figura 5: Tinción HyE de las neuronas que componen el ganglio trigémino. Neuronas tipo A (grandes) y neuronas tipo B (pequeñas).

En el ganglio de Gasser se encuentran fibras nerviosas mielínicas y amielínicas. Las fibras nerviosas sensitivas se dividen en cuatro grupos en función del diámetro de la fibra y la velocidad de la conducción. Las fibras de los grupos I, II y III son las más grandes, presentan una mayor velocidad de conducción y son fibras mielínicas. Las fibras del grupo IV son las más pequeñas, presentan una menor velocidad de conducción y son fibras amielínicas. Hay una relación entre la modalidad sensorial y el tipo de fibra que la conduce. Los grupos III y IV se encargan de la nocicepción y termorrecepción (dolor y temperatura). Las sensaciones mecánicas (mecanorrecepción) se conduce a su vez por los grupos II y IV y de los estímulos propioceptivos se encargan los grupos I y II. Asimismo, el tamaño

de las fibras nerviosas y la velocidad de conducción del impulso nervioso están relacionados con el tamaño de la neurona. Las neuronas de tipo A tienen una mayor velocidad (fibras miélicas) y las C (amiélicas) menor.

En cuanto a su composición bioquímica también se describió diferencias. Las tipo A tienen grandes cúmulos de neurotransmisores de glutamina y anhidrasa carbónica (AC), neuropéptido Y (NPY), péptido 19 (PEP 19) y menos cantidad de calbindina D-28k (CB) que en los demás grupos. Las tipo B menor glutamina y AC y las neuronas tipo C gran afinidad por la glutamina y actividad de fosfatasa ácida, así como mayor cantidad de sustancia P y somatoestatina [22, 23, 24].

OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo principal del presente trabajo es el estudio de la participación del ganglio del trigémino en la evolución de la enfermedad de scrapie. Para ello se establecieron los siguientes objetivos concretos:

- Estudio de la presencia de la PrPsc en el ganglio del trigémino de animales afectados por la enfermedad de scrapie.
- Estudio de la relación entre la diseminación de la PrPsc en el SNC, el SLR y el SNP en la enfermedad de scrapie.
- Estudio de la posible existencia de lesiones histopatológicas en el SNP en la enfermedad de scrapie.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS

En el presente estudio se analizaron muestras del SNC, SNP y SLR procedentes de ovejas afectadas de la enfermedad de scrapie. Las muestras analizadas fueron médula oblongada a nivel del obex, ganglio retrofaríngeo y ganglio del nervio trigémino o de Glasser. Las muestras fueron cedidas por el Centro de Encefalopatías Espongiformes y Enfermedades Emergentes de la Universidad de Zaragoza.

Las muestras procedían de 14 ovejas afectadas por la enfermedad scrapie detectadas en el programa de vigilancia de las EET de Aragón. Todos los animales presentaban signos clínicos compatibles con scrapie; los animales se dividieron en 2 grupos según la fase clínica de la enfermedad en que se encontraban en el momento del sacrificio, fase clínica y fase terminal. La enfermedad fue confirmada post mórtem mediante la técnica IHQ para la detección de la proteína PrPsc en el SNC (en la médula oblongada a nivel del obex). Todas las ovejas eran adultas, entre 2 y 8 años de edad, de sexo

hembra y de raza Rasa Aragonesa a excepción de un cruce (nº 1627). De los 14 animales, 10 presentaban el genotipo ARQ/ARQ, 2 ARH/ARH y 2 ARQ/ARH. Los datos individuales de los animales incluidos en el estudio se detallan en la Tabla 3.

TABLA 3: Características de las ovejas afectadas por scrapie utilizadas en el estudio

ID	Genotipo	Fase clínica	Edad
1550	ARQ/ARQ	Clínica	2 años
1552	ARQ/ARQ	Clínica	2 años
1553	ARQ/ARQ	Clínica	2 años
1604	ARQ/ARQ	Clínica	3 años
1606	ARQ/ARH	Clínica	6 años
1608	ARQ/ARQ	Clínica	6 años
1610	ARQ/ARQ	Clínica	7 años
1627	ARH/ARH	Clínica	2 años
1631	ARQ/ARH	Terminal	5 años
1636	ARQ/ARQ	Clínica	5 años
1637	ARQ/ARQ	Clínica	3 años
1639	ARQ/ARQ	Terminal	4 años
1646	ARH/ARH	Clínica	8 años
1681	ARQ/ARQ	Terminal	2 años

I.D. (identificación), De cada animal se incluye el número de identificación, el genotipo, la fase clínica de la enfermedad y edad en el momento del sacrificio.

Los animales fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de barbitúrico (pentobarbital de sodio) y tras su exsanguinación se les realizó la necropsia y se obtuvieron las muestras incluidas en el presente estudio.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras se fijaron en formol, se incluyeron en parafina y se procesaron de acuerdo a los procedimientos estándar para su estudio histopatológico e inmunohistoquímico. De cada muestra se realizaron cortes histológicos de 4 µm, se montaron en portas y se desparafinaron en xylol y etanol.

Para el estudio inmunohistoquímico, a cada corte se le aplicó los siguientes pretratamientos con el objetivo de desenmascarar epítomos: 1) inmersión en ácido fórmico al 98% durante 15 minutos; 2) tratamiento con proteinasa K (F. Hoffmann La Roche Ltd, 211 Suiza) con 4 mg / ml de proteinasa K en bufer de digestión (50 mmol de TrisHCl, 1 mmol de EDTA, 0.1% de Tween 20, pH 8.3) durante 15 min a 38 °C; 3) autoclavado hidratado en bufer citrato durante 15 minutos a 121 °C. Posteriormente las secciones se inmunutñieron, utilizando un inmunoteñidor automático. En el procesado, se realizaron los siguientes pasos intercalados por lavados con TBS: 1) bloqueo de la peroxidasa endógena mediante la aplicación de la solución de bloqueo durante 5 min; 2) incubación con el anticuerpo antiPrP L42 (0,046 mg / ml; R Biopharm Ltd., Alemania) durante 30 minutos; 3) incubación con el sistema de visualización EnVision durante 30 minutos; 4) aplicación del cromógeno diaminobencidina durante 10 minutos. Los cortes

se lavaron con agua destilada y se tiñeron con hematoxilina durante 5 min. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. A menos que se indique lo contrario, todos los productos se obtuvieron de Dako (Dinamarca).

EVALUACIÓN DEL TEJIDO

La presencia / ausencia de depósitos de PrPsc en el tejido y sus características fueron evaluadas en secciones de médula oblongada, ganglio retrofaríngeo y ganglio trigémino.

En la sección de **médula oblongada** la PrPsc marcada por inmunotinción se evaluó en tres grados de tinción:

- Grado 1, caracterizado por la acumulación de PrPsc en el núcleo dorsal del nervio vago.
- Grado 2, caracterizado por la acumulación de PrPsc en el núcleo dorsal del nervio vago, el tracto solitario y el núcleo hipogloso.
- Grado 3, caracterizado por depósitos de PrPsc extendidos en toda la sustancia gris, incluyendo el núcleo de la oliva y la formación reticular.

En el **ganglio retrofaríngeo** la PrPsc marcada por inmunotinción se evaluó en tres grados de tinción:

- Grado 1: presencia de PrPsc en aproximadamente un 25% de los folículos linfoides presentes en el corte.
- Grado 2: presencia de PrPsc en aproximadamente un 50 % de los folículos linfoides.
- Grado 3: presencia de PrPsc en aproximadamente un 75% o superior de los folículos linfoides.

Respecto al **ganglio del trigémino**, objetivo principal del estudio, en cada muestra se estudió:

- La vacuolización neuronal: positiva o negativa en caso de su existencia o no en las muestras estudiadas.
- La localización del depósito de PrPsc: se estudió la presencia/ausencia de PrPsc en las neuronas, células satélites, fibras nerviosas y tejido conectivo del ganglio.

Para evaluar los parámetros que se exponen a continuación, cada muestra de ganglio trigémino se dividió en 2 partes, de las cuales se visualizaron con el objetivo de 40x dos campos diferentes escogidos al azar.

- Tipo de depósito en las neuronas: se evaluó si los depósitos de PrPsc se encontraban intraneuronales o perineuronales. Debido a que en muchas muestras se encontraron ambos tipos de depósito, éstas se clasificaron en intraneuronales / perineuronales o perineuronales / intraneuronales, en función del tipo de depósito mayoritario en el campo muestral.

– Número y tipo de neuronas que presentaban depósitos de PrPsc. Para ello se analizaron los dos campos elegidos al azar de cada muestra y se sumaron sus resultados. Para cada muestra se analizó:

* *Nº de neuronas totales* que componen los campos de la muestra estudiados, y de éstas el nº de neuronas inmunoteñidas con depósitos de PrPsc, representándolas en tanto por ciento. A partir del tanto por ciento obtenido se obtuvo el grado de inmunotinción del campo total afectado clasificado en 4 grupos en función del número de neuronas que presentaban depósitos de PrPsc.

Grado 1: < 25% de las neuronas con depósitos de PrPsc.

Grado 2: 25–50 % de las neuronas con depósitos de PrPsc.

Grado 3: 50–75% de las neuronas con depósitos de PrPsc.

Grado 4: > 75% de las neuronas con depósitos de PrPsc.

* *Nº de neuronas grandes o Tipo A* que componen el campo, y de éstas el nº de afectadas con depósitos de PrPsc.

* *Nº de neuronas pequeñas o Tipo B* que componen el campo, y de éstas nº de afectadas con depósitos de PrPsc. Debido a la dificultad en la observación de la preparación por el corte de la muestra, se han tomado como células pequeñas (tipo B) aquellas de pequeño tamaño tanto cuando se observaba el núcleo como cuando no.

RESULTADOS

Todos los animales incluidos en el estudio presentaban depósitos de PrPsc en el SNC, el SNP y el SLR. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

En todos los casos se observó una amplia diseminación de la PrPsc en el SNC. Con una excepción (nº 1636), todas las muestras de la médula oblongada presentaron un grado de inmunotinción 3 (depósitos de PrPsc extendidos en toda la sección; Figura 6a). En el SLR se observó una mayor variación en el ganglio retrofaríngeo, 4 muestras presentaron un grado 3 de inmunotinción (Figura 6b), otras 4 muestras un grado 2 y 6 muestras un grado 1 (menos del 25% de los folículos linfoides positivos).

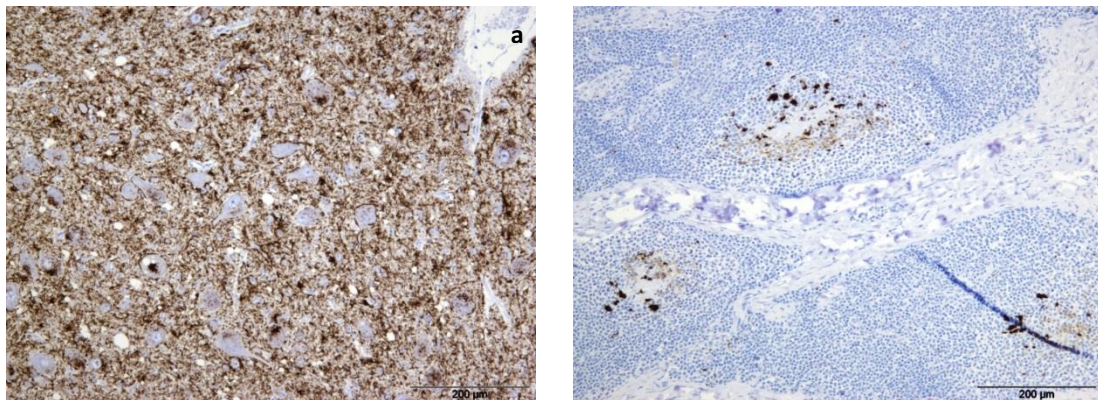


Figura 6: Grado 3 de inmunotinción de PrPsc de la médula oblongada (a) y ganglio retrofaríngeo (b) de una oveja afectada por scrapie. Técnica IHQ.

Detección de PrPsc en el ganglio del trigémino

En todas las muestras procedentes del ganglio de trigémino se detectaron depósitos de PrPsc. La inmunotinción se detectó en las neuronas ganglionares y en las células satélites, pero en ningún caso en las fibras nerviosas ni en el tejido conectivo del ganglio (Figura 7).

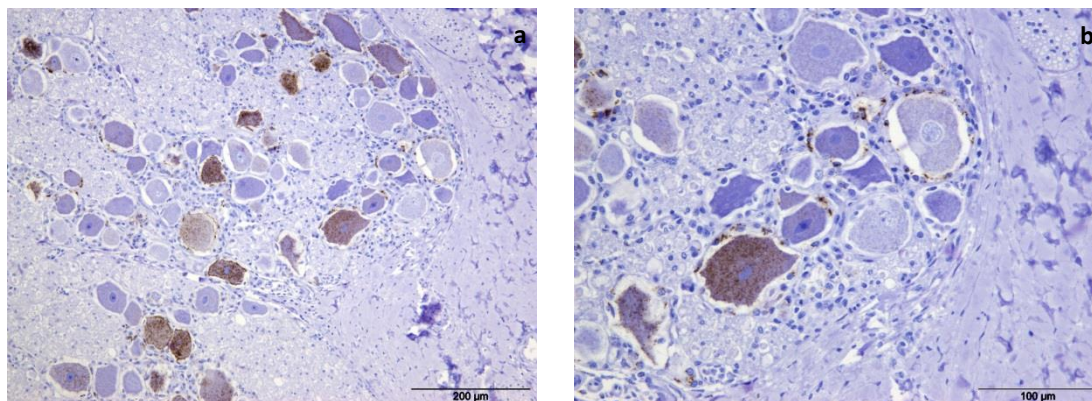


Figura 7: Detección inmunohistoquímica de PrPsc en el ganglio del trigémino de una oveja afectada por scrapie. Depósitos de PrPsc en los somas neuronales y células satélites (a). Detalle del depósito en neuronales y células satélites.

De las 14 muestras estudiadas, 5 de ellas presentaban vacuolización intraneuronal positiva, aunque sólo se observaron 1 o 2 neuronas vacuolizadas por muestra (Figura 8). De estas 5 muestras, 4 de ellas presentaban un tipo de depósito de PrPsc intraneuronal/perineuronal.

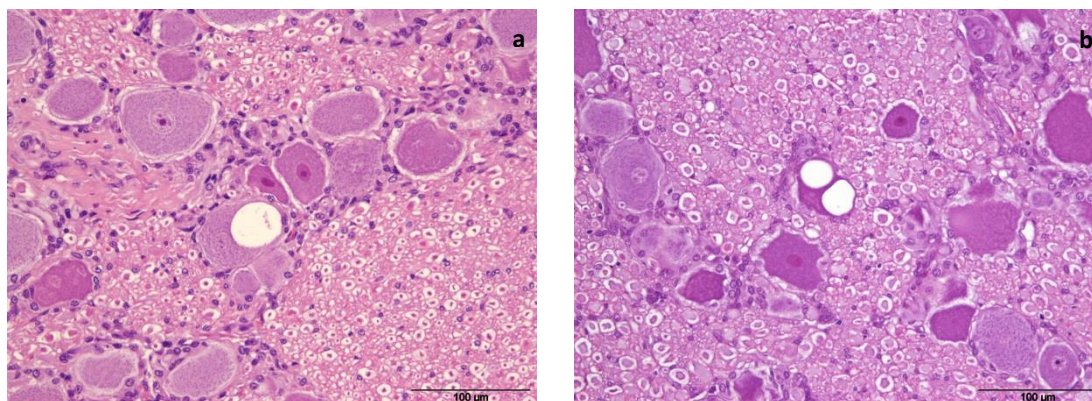


Figura 8: Vacuolización neuronal del ganglio trigémino de una oveja afectada por scrapie. Neurona con 1 vacuola (a) y con 2 vacuolas (b) Tinción HyE.

Todas las muestras del estudio presentaban depósitos de PrPsc en las neuronas ganglionares. En más de la mitad de las muestras (9 de 14), el campo total afectado era de grado 2, es decir, entre el 25-50% de las neuronas contenían depósitos de PrPsc. Las 5 muestras restantes estaban afectadas por un grado 1, con menos del 25% de neuronas positivas. En ninguna de las muestras se observaron más del 50% de las neuronas con presencia de depósitos PrPsc (grado 3 o 4).

Respecto al tipo de depósito de PrPsc, 7 de las 14 muestras presentaban un depósito excepcionalmente intraneuronal en los campos estudiados, frente a las otras 7 que presentaban ambos tipos de depósitos

(intraneuronal y perineuronal; Figura 9a). En ninguna de las muestras se encontró exclusivamente un depósito de tipo perineuronal.

De las 14 muestras estudiadas, 12 presentaron depósitos de PrPsc en células satélite. Las 2 muestras restantes, no presentaron PrPsc en las células satélite de los campos estudiados, aunque al observar al microscopio las muestras completas sí se detectó la presencia de PrPsc en células satélite de otras zonas de la muestra.

Respecto al tipo de neuronas, en todas las muestras se observaron depósitos de PrPsc en neuronas grandes (tipo A) y pequeñas (tipo B; Figura 9b). El número de células tipo B fue mayor en todas las muestras, excepto en un caso (nº 1631). Sin embargo, en todas las muestras se observó una mayor proporción de células grandes (tipo A) con depósito de PrPsc que de pequeñas (tipo B).

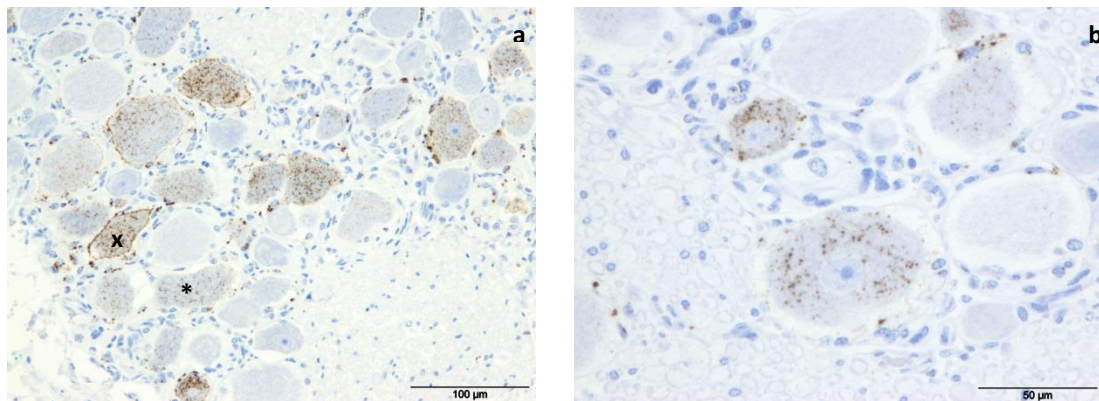


Figura 9: Tinción intraneuronal (*) e intraneuronal y perineuronal (x) en neuronas del ganglio trigémino de una oveja afectada por scrapie (a). Inmunotinción en neuronas grandes (tipo A) y pequeñas (tipo B) del ganglio trigémino de una oveja afectada por scrapie. Técnica IHQ.

TABLA 2: Resultados de los depósitos de PsPsc en las diferentes muestras de ovejas.

ID- edad años	Grado de Inmunotinción		Ganglio Trigémino						
	Médula Oblongada	Ganglio Retrofaríngeo	Tipo de depósito	Células satélites	Vacuolización	Nº Neuronas positivas / Nº total de neuronas	Campo Total	Nº Neuronas A positivas / Nº total de neuronas A	Nº Neuronas B positivas / Nº total de neuronas B
1550 – 2	3	2	Intraneuronal	+	–	17 /41 (41,4%)	2	11/16 (68,7%)	6/25 (24%)
1552– 2	3	1	Perineuronal ²	+	+	16/31 (51,6%)	2	7/11 (63,6%)	9/21 (42,8%)
1553– 2	3	3	Intraneuronal ¹	+	–	12/49 (24,4%)	1	5/13 (38,4%)	7/36 (19,5%)
1604 – 3	3	1	Intraneuronal	–	–	8/26 (30,7%)	2	4/7 (57,1%)	4/18 (22,2%)
1606 – 6	3	3	Intraneuronal	+	–	16/30 (53,3%)	2	7/10 (70%)	9/20 (45%)
1608 – 6	3	2	Intraneuronal ¹	+	–	22/51 (23,1%)	1	15/19 (78,9%)	7/32 (21,8%)
1610 – 7	3	1	Intraneuronal	+	+	33/73 (45,2%)	2	11/13 (84,6%)	22/60 (36,7%)
1627 – 2	3	2	Intraneuronal ¹	+	+	23/85 (27,0%)	2	9/15 (60%)	14/70 (20%)
1631 – 5	3	3	Intraneuronal	+ ³	–	7/37 (18,9%)	1	5/23 (21,7%)	2/14 (14,2%)
1636 – 5	2	2	Intraneuronal	–	–	8/58 (13,7%)	1	3/7 (42,8%)	5/51 (9,8%)
1637 – 3	3	3	Intraneuronal	+	–	7/42 (16,7%)	1	3/15 (20%)	4/27 (14,8%)
1639 – 4	3	1	Intraneuronal ¹	+	+	11/34 (32,3%)	2	7/15 (46,7%)	4/19 (21%)
1646 – 8	3	1	Perineuronal ⁴	+	–	11/42 (26,2%)	2	5/13 (38,4%)	6/29(20,6%)
1681 – 2	3	1	Intraneuronal ¹	+	+	19/56 (33,9%)	2	8/17 (47%)	11/37 (29,7%)

ID (Identificación de las muestras),

¹Depósito Intraneuronal/perineuronal en uno de los campos. ²Depósito Perineuronal/intraneuronal en uno de los campos. ⁴Depósito Intraneuronal en uno de sus campos.

³Células satélites negativas en uno de los campos.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que en fases avanzadas de la enfermedad scrapie la PrPsc se deposita, además de en el SNC, en el ganglio del trigémino. Todos los casos incluidos en el estudio presentaban signos clínicos y una gran cantidad de PrPsc en el SNC (médula oblongada). Asimismo, todos los animales presentaban depósitos de PrPsc en el ganglio del trigémino, aunque en una menor cantidad que en el SNC, ya que ningún animal tenía más del 50% de las neuronas ganglionares afectadas. Se ha demostrado que en el scrapie la PrPsc asciende desde el intestino hasta el encéfalo a través de las fibras del nervio vago, y a la médula espinal torácica, a través de las fibras del circuito esplánico. Una vez llega al SNC, el prión se disemina caudal y cranealmente por todo el sistema [25]. Experimentalmente se ha demostrado que desde el SNC el prión se transporta centrífugamente hacia otros órganos a través del SNP [26]. De acuerdo con este estudio experimental, nuestros resultados sugieren que el prión se disemina desde el SNC hacia el ganglio del trigémino, ya que se observó un elevado grado de inmunotinción en la médula oblongada frente al grado mucho menor del ganglio del trigémino. Asimismo, las neuronas del ganglio trigémino están relacionadas con los núcleos localizados en el tronco del encéfalo y la médula oblongada, la zona del SNC donde más tempranamente se deposita la PrPsc y donde se acumula con una mayor intensidad. Esta relación anatómica facilitaría la diseminación de la PrPsc desde el SNC hacia el ganglio del trigémino.

En el ganglio del trigémino la PrPsc se localizó en los somas neuronales, pero no se observó en las fibras nerviosas del ganglio. Aunque la implicación del SNP en la patogénesis del scrapie se ha demostrado [25], en pocos trabajos se describe una inmunotinción en fibras nerviosas periféricas [22] posiblemente debido a la escasa cantidad de PrPsc presente en cada fibra. La utilización de técnicas más sensibles de detección de la PrPsc podría permitir su detección en las fibras nerviosas del ganglio.

Además de en los somas de las neuronas ganglionares, la PrPsc se localizó en las células satélite. Estas células son células gliales que rodean completamente los somas neuronales. Aunque el mecanismo por el cual las células satélite adquieren la PrPsc no se conoce, el estrecho contacto existente entre estos dos tipos celulares podría facilitar la diseminación de la PrPsc desde el soma neuronal hacia las células satélite.

En relación al tipo de neuronas que componen el ganglio trigémino, se observa una mayor cantidad de células grandes (tipo A) con depósitos de PrPsc, lo que sugiere que el prión tiene una afinidad diferente entre las subpoblaciones neuronales del ganglio. Se han descrito diferencias en la composición bioquímica de los distintos tipos neuronales [17, 18, 19] que

podrían explicar estas diferencias de afinidad. Sin embargo, serían necesarios futuros estudios para analizar la relación entre el prión y los diferentes tipos de neuronas.

El grado de implicación del tejido linfoide en la patogénesis del scrapie depende en gran medida del genotipo del animal [7,27]. Todos los animales del estudio presentaban un genotipo incluido en la clasificación de riesgo 3 (susceptibilidad moderada a la enfermedad) y presentaron depósitos de PrPsc en el ganglio retrofaríngeo. Sin embargo, no se observó una relación entre la cantidad de depósitos de PrPsc en el ganglio retrofaríngeo y la del trigémino, ya que los animales con un mayor grado de inmunotinción en el retrofaríngeo (grado 3) no tenían un mayor porcentaje de neuronas ganglionares positivas. Estos resultados sugieren que la diseminación del prión en el SLR es independiente de la diseminación en el SNP. Por otro lado, la influencia del genotipo en la diseminación de la PrPsc en el SNP no se ha podido detallar. Para ello, será necesario la elaboración de un estudio con mayor cantidad muestral genotípica ya que en este estudio sólo se han podido disponer de 14 muestras, 11 de las cuales tenían el mismo genotipo (ARQ/ARQ) y 3 con genotipo distinto (ARQ/ARH, ARH/ARH) (Tabla 1).

En las EET, las lesiones histopatológicas se localizan exclusivamente en el SNC. La vacuolización intraneuronal y del neuropilo de la sustancia gris es la lesión característica de las EET. En el presente estudio, se observó una vacuolización intraneuronal en 5 muestras de ganglio del trigémino. La vacuolización del tejido nervioso puede producirse en animales no afectados por una EET debido a diferentes causas relacionadas principalmente con la toma y el procesamiento de la muestra o con alteraciones tóxicas y metabólicas. Así, la autólisis del tejido produce una vacuolización generalmente perineuronal y con una distribución uniforme en toda la muestra, y la congelación produce numerosas vacuolas alargadas u ovoides con disposición regular y lineal. En las alteraciones tóxicas y metabólicas se suele observar una vacuolización en la sustancia blanca [3]. Los animales incluidos en el presente estudio fueron sacrificados y las muestras se tomaron inmediatamente tras el sacrificio fijándose en formol, por lo que no estaban autolíticas ni congeladas. Además, las vacuolas intraneuronales del ganglio del trigémino fueron similares a las que se observan en núcleos del SNC en el scrapie: de gran tamaño, 1 o 2 vacuolas por neurona y pocas neuronas vacuolizadas. Hasta lo que nosotros conocemos, esta es la primera descripción de una vacuolización intraneuronal asociada a una EET en el SNP.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Imran M, Mahmood S.** An overview of human prion diseases. *Viol J.* 2011 Dec 24; 8:559.
2. **Smith CB, Booth CJ, Pedersen JA.** Fate of prions in soil: a review. *J Environ Qual.* 2011 Mar–Apr; 40(2):449–61. Review.
3. **JJ Badiola Díez, M Pumarola i Batlle.** Encefalopatías Espongiformes Transmisibles. 1 Edición. Barcelona: MAYO; 2010. p. 33–47
4. **Registro Nacional de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles Humanas (RNEETH).** Las encefalopatías espongiformes transmisibles humanas. Una visión desde la salud pública. Área de Epidemiología Aplicada. Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII: Madrid; 10 abril 2008.
5. **MJ Moreno, J Romero.** La enfermedad de Creutzfeldt–Jakob esporádica: variabilidad fenotípica. *Neurología.* 2002 Aug–Sep; 17(7):366–77.
6. **Lee J, Kim SY, Hwang KJ, Ju YR, Woo HJ.** Prion Diseases as Transmissible Zoonotic Diseases. *Osong Public Health Res Perspect.* 2013 Feb; 4(1):57–66.
7. **Beekes M, McBride PA.** The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS J.* 2007 Feb; 274(3):588–605. Review.
8. **A Brun a, J Castilla a, B Parra a, F Rodríguez b, JM Torres a.** Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las encefalopatías espongiformes transmisibles. *Rev Neurol.* 2003 Oct 1–15; 37(7):648–53.
9. **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* 1996Apr 6; 347(9006):921–5.
10. **A. Brun, J Castilla, JM Torres.** Encefalopatías espongiformes transmisibles en animales. *Rev Neurol.* 2000 Jul 16–31; 31(2):133–7.
11. **A Alipio, F Hernández, CG Céspedes, S Romero.** Encefalopatía espongiforme bovina o “enfermedad de las vacas locas”. *Gac Méd Caracas* 2002; 110(2):151–165.
12. **S Zuñiga–Quiñonez, MC Urista–Vidrio, JL Ruiz–Sandoval.** Enfermedad de Creutzfeldt Jacob. Del Kuru a las vacas locas. *Revista Mexicana de Neurociencia* 2002; 3(1): 13–19.

13. **Hernández-Ramos FJ, Martínez Martín M, Esteban Robayna M, Jensen Toll F, Palacios Llopis S.** A propósito de la incidencia de la enfermedad de Creutzfeldt–Jakob en el área de salud de Lanzarote. Descripción de dos casos definitivos. *Neurologia*. 2005 Jan–Feb; 20(1): 41–4.
14. **Will RG, Ward HJ.** Clinical features of variant Creutzfeldt–Jakob disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004; 284:121–32. Review.
15. **Monleón E, Garza MC, Sarasa R, Alvarez–Rodriguez J, Bolea R, Monzón M, Vargas MA, Badiola JJ, Acín C.** An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third–eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Vet Microbiol*. 2011 Jan 27; 147(3–4):237–43.
16. **McBride PA, Beekes M.** Pathological PrP is abundant in sympathetic and sensory ganglia of hamsters fed with scrapie. *Neurosci Lett*. 1999 Apr 16; 265(2):135–8.
17. **Peden AH, Ritchie DL, Head MW, Ironside JW.** Detection and localization of PrPSc in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt–Jakob disease. *Am J Pathol*. 2006 Mar; 168(3):927–35.
18. **Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.** Técnicas de diagnóstico de la EEB y del Scrapie establecidas por la Organización Internacional de Epizootías. Programa de Vigilancia de las EETs (Reglamento 999/2001).
19. **Sobotta, J.** Atlas de Anatomía Humana. 23ª Edición. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2012.
20. **Finn Geneser.** Histología. 3ª Edición. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2000.
21. **Lazarov NE.** Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol*. 2002 Jan; 66(1):19–59. Review.
22. **Garza MC, Monzón M, Marín B, Badiola JJ, Monleón E.** Distribution of Peripheral PrPSc in Sheep with Naturally Acquired Scrapie. *PLoS One*. 2014 May 14; 9(5):e97768.
23. **Lazarov NE.** Neurobiology of orofacial proprioception. *Brain Res Rev*. 2007 Dec; 56(2):362–83. Epub 2007 Sep 5. Review.
24. **M Martínez, NY Quiroga, JE Castellanos, H Hurtado.** Subpoblaciones neuronales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomédica* 2000; 20:248–60.

25. Van Keulen LJ, Schreuder BE, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA.
Pathogenesis of natural scrapie in sheep. Arch Virol 2000; Suppl: 57–71.
26. Crozet C, Lezmi S, Flamant F, Samarut J, Baron T, et al. Peripheral circulation of the prion infectious agent in transgenic mice expressing the ovine prion protein gene in neurons only. J Infect Dis. 2007; 195: 997–1006.
27. Jeffrey M, González L. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 2007 Aug; 33(4):373–94. Review.