

## MODELOS ANIMALES PARA LA INVESTIGACIÓN DE PRIONES

### ANIMALS MODELS FOR PRION INVESTIGATION

Ana María Soto Carrión, Ana María Doménech Gómez, M<sup>a</sup> Esperanza Gómez-Lucía y Duato  
Departamento Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria, UCM. Madrid

#### RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes constituyen un grupo de enfermedades con un periodo de incubación muy largo, durante el cual la isoforma patógena PrP<sup>res</sup> se acumula lentamente en el cerebro hasta que alcanza suficiente concentración como para que se manifiesten los síntomas. Para el estudio de las mismas, y sobre todo para determinar las relaciones etiológicas entre los PrP<sup>res</sup> de distintas enfermedades se recurre al empleo de modelos animales, especialmente los ratones transgénicos, en los que se ha sustituido su propio gen *Prnp* por el de otra especie. De esta forma, el patrón lesional, de vacuolización y de Western Blot es igual que en la especie original, con la ventaja de que la enfermedad se produce más rápidamente y la comodidad de infraestructuras y ética de trabajar con ratones.

**Palabras claves:** modelos animales, priones, encefalopatías espongiformes, ratones transgénicos

#### ABSTRACT

Spongiform encephalopathies are a group of diseases with very long incubation times, during which the pathogenic isoform PrP<sup>res</sup> accumulates slowly in the brain, till it reaches a high enough concentration as to develop clinical signs. To study these diseases, and especially to determine the etiological relationships between the PrP<sup>res</sup> from different diseases, animal models are used, mostly transgenic mice, in which their own *Prnp* gene is substituted by that from other species. In this way, the lesions and vacuolization pattern, as well as the Western Blot profile is like those in the original species, with the advantage that the course of the disease is faster and the convenience of infrastructures and ethical considerations of working with mice.

Key words: animal models, prions, spongiform encephalopathies, transgenic mice.

#### INTRODUCCIÓN

Los agentes infecciosos que causan las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) se denominan priones y afectan a un amplio abanico de especies, entre las que se encuentran los seres humanos. Se considera que están causadas por la acumulación de una forma patológica e infecciosa (PrP<sup>Sc</sup> o PrP<sup>res</sup>) de una proteína celular (PrP<sup>c</sup>) cuya secuencia de

aminoácidos se encuentra altamente conservada en mamíferos. En la década de los 80-90 se diagnosticaron numerosos casos de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) en el Reino Unido. En 1996 se describió la nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob humana (nvECJ) que se asoció al consumo de carne de vacuno con EEB, por lo que se considera una zoonosis, lo que conllevó a la necesidad de un estudio más exhaustivo del agente causante (prión) y de su forma de transmisión. Una de las estrategias para conseguir este objetivo fue el desarrollo de modelos animales, fundamentalmente de laboratorio, en los que poder analizar más “rápidamente” la patogenia del proceso.

## DESARROLLO

Las Encefalopatías Espongiiformes Transmisibles (EETs) son un grupo muy amplio de enfermedades que se caracterizan por presentar un periodo de incubación prolongado, una sintomatología nerviosa progresiva fatal y una degeneración de tipo espongiiforme en el encéfalo, acompañado de astrocitosis y pérdida de masa neuronal (Béringue *et al.*, 2008), debido a la presencia de la proteína prion patógena.

Entre las EETs han tenido más relevancia pública las siguientes (Tablas 1 y 2):

- Scrapie (prurito lumbar ovino o tembladera ovina): enfermedad de los ovinos, que fue descrita por primera vez en el siglo XVIII. Está producida por un mosaico de cepas de priones (PrP<sup>Sc</sup>) que pueden distinguirse entre sí por sus características biológicas y químicas (Bruce *et al.*, 2003). Esta enfermedad es endémica del Reino Unido y se manifiesta, además de por un cuadro nervioso, por problemas dérmicos debidos al intenso prurito que presentan las ovejas infectadas.
- Encefalopatía Espongiiforme Bovina (EEB): afecta al ganado bovino. Se describió en 1986 en el Reino Unido extendiéndose posteriormente al resto de la Unión Europea y a algunos otros países no europeos. Está producida por el prión similar al causante del scrapie, denominado PrP<sup>BSE</sup>, siguiendo la denominación anglosajona (Bovine Spongiform Encephalitis).
- Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ): existen diversas formas de esta enfermedad que afecta a los seres humanos, dependiendo del agente prión causante de la enfermedad (PrP<sup>CJD</sup>).
- Nueva Variante de Creutzfeldt-Jakob (nvECJ): se describió en 1996 en Reino Unido en 10 personas con un cuadro de ECJ diferente al clásico y en las que se observó un patrón de lesiones neurológicas más similar al de la EEB. Varios estudios confirmaron que la ingestión de PrP<sup>BSE</sup> en productos cárnicos de origen bovino pudo dar lugar a esta nueva

variante de ECJ (Collinge *et al.*, 2001).

**Tabla 1:** EETs más relevantes y sus características

<b>Enfermedad</b>	<b>Scrapie</b>	<b>Encefalopatía Espongiforme Bovina</b>	<b>Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y nueva variante de ECJ</b>
<b>Hospedador natural</b>	Oveja y cabra	Vaca	Ser humano
<b>Proteína prión</b>	Prión scrapie (PrP <sup>Sc</sup> )	Prión BSE (BovPrP <sup>Sc</sup> o PrP <sup>BSE</sup> )	Prión ECJ (PrP <sup>CJD</sup> )
<b>Patogenia y lesiones</b>	Tejido linforreticular y SNC	Intestino Delgado y SNC	SNC
<b>Diagnóstico</b>	Histopatológico del SNC y WB	Histopatológico del óbex y/o WB	Encefalograma, análisis del LCR, resonancia magnética. Confirmación post-mortem por histopatología del SNC y WB
<b>Control</b>	Sacrificio de los animales	Sacrificio de los animales	No existe control, pero sí que es posible determinar el tipo de ECJ: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Esporádica (mutación somática)</li> <li>- Familiar</li> <li>- Iatrogénica</li> <li>- nvECJ</li> </ul>

SNC, sistema nervioso central; WB, Western Blot

**Tabla 2:** Sintomatología de las EETs más relevantes.

<b>BSE (Bóvidos)</b>	<b>Nueva variante de Creutzfeldt-Jakob ( seres humanos)</b>	<b>Scrapie (óvidos)</b>
<p>Incubación: alrededor de 5 años.</p> <p>Duración del cuadro clínico: de uno a dos meses.</p> <p>Problemas a nivel nervioso con incoordinación motora, temblores musculares, disminución de peso y de producción.</p> <p>Cambios de comportamiento.</p>	<p>Incubación: varios años</p> <p>Duración del cuadro clínico: meses</p> <p>Demencia, ataxia, rigidez muscular, dolor de cabeza, cansancio, sueño e inapetencia.</p> <p>Cambios de conducta, falta de coordinación muscular e insensibilidad táctil.</p>	<p>Incubación: varios años</p> <p>Duración del cuadro clínico: unos seis meses.</p> <p>Síntomas: alteraciones nerviosas y temblores a nivel de cabeza y cuello.</p> <p>Cambios de comportamiento</p> <p>Prurito intenso</p> <p>Reflejo de mordisqueo</p>

## LOS PRIONES Y LAS EETs

Los priones ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) son una isoforma anormal de una proteína celular normal ( $\text{PrP}^{\text{c}}$ ) presente en todos los mamíferos, y que está codificada en un gen cromosómico muy similar entre las distintas especies de mamíferos (*PrnP* o *PrnP*). Se cree que  $\text{PrP}^{\text{res}}$  es capaz de transformar la estructura secundaria de la  $\text{PrP}^{\text{c}}$ , cambiando las alfa-hélices por beta-láminas. Este cambio favorece la resistencia parcial a la digestión por proteinasa K, por lo que la proteína prión también se denomina  $\text{PrP}^{\text{res}}$  (resistente a la proteinasa K). Esta transformación tridimensional junto con la resistencia a la digestión de la enzima anteriormente mencionada, ayuda a diferenciar la proteína priónica patógena de la normal.

Se ha descrito la existencia de diferentes “cepas” de priones a partir de estudios experimentales de diferentes aislados de casos de EETs en diversas estirpes de ratones. La tipificación de estas cepas se hace mediante el estudio de ciertas características que definen su “fenotipo” tras su inoculación en ratones: el periodo de incubación hasta que aparece el cuadro nervioso, y el modelo de lesiones y su localización característica en el encéfalo. Además, por análisis de Western blot de los priones tratados con proteinasa K se han podido identificar cuatro patrones distintos de digestión parcial por esta enzima, que permite diferenciar las diferentes cepas de priones (Tabla 3).

**Tabla 3:** Criterios para distinguir de forma experimental las cepas de priones tras su inoculación en diversas estirpes de ratones (adaptado de Béringue *et al.*, 2008).

CRITERIOS	PROTOCOLO EMPLEADO
Periodo de incubación en animales receptores	Medida del tiempo de incubación entre la inoculación y la aparición de la enfermedad o la muerte del animal
Presentación de la enfermedad	Test de comportamiento y signos clínicos.
Propiedades bioquímicas	Modelo o patrón de digestión por proteinasa K en un Western Blot
Distribución en el cerebro de la $\text{PrP}^{\text{res}}$	Inmunohistoquímica
Naturaleza de los depósitos de $\text{PrP}^{\text{res}}$	Histología
Distribución e intensidad de las lesiones espongiformes y la vacuolización	Histología

## **BARRERA INTERESPECIE**

Se denomina barrera interespecie a la dificultad que se observa para infectar animales de una especie con algún agente patógeno propio de otra especie diferente. En el caso de las EETs la transmisión de priones entre distintas especies es muy poco eficaz y sucede con un prolongado tiempo de incubación. En este grupo de enfermedades se cree que el concepto de barrera interespecie depende de la secuencia de aminoácidos del prión patógeno exógeno y la PrP<sup>c</sup> (normal) de cada una de ellas; así, cuanto más similar sea esa secuencia más fácil será su transmisión. Por ejemplo, las PrP de oveja y vaca son diferentes en sólo 7 aminoácidos. Una vez que se supera la barrera de especie, el prion adquiere la secuencia de aminoácidos determinada por el gen *PrnP* del animal receptor y en sucesivos pases se acorta el periodo de incubación (Béringue *et al.*, 2008).

Dado lo prolongado de los tiempos de incubación de las enfermedades por priones, que indefectiblemente se alargan todavía más cuando se “salta” la barrera interespecie, los investigadores han recurrido al empleo de los modelos animales para estudiar diversas hipótesis de cómo los priones presentes en el ganado bovino pudieron infectar a los seres humanos. Se ha comprobado que cuando el prión procedente de una especie está adaptado a una nueva se reproduce el mismo patrón de lesiones y de vacuolización espongiiforme que en la especie original (Béringue *et al.*, 2008).

## **MODELOS ANIMALES**

En la actualidad, el mejor método de estudio de las EETs y de los priones es la transmisión experimental a animales, en la propia especie hospedadora (rumiantes, monos, etc.) o en animales de laboratorio, como ratones y hámster. Para esta segunda opción es necesario superar la barrera entre especies de los priones, lo que se ha conseguido mediante el uso de los ratones modificados genéticamente.

Hasta la fecha, los animales más utilizados en la investigación en priones son los ratones, seguidos de los hámsteres y cobayas, y del resto de animales, como los cerdos, ovejas. Curiosamente, los conejos no actúan como buenos modelos porque son resistentes a la infección por priones (Vorberg *et al.*, 2003). Los roedores de laboratorio poseen como ventaja frente al resto de animales que son de fácil cuidado y mantenimiento, con un costo accesible de manutención; tienen alta capacidad reproductiva y un tiempo corto de generación; existe mucha información sobre diferentes especies (estirpes) de roedores, con un gran número de líneas bien definidas y stocks de roedores tradicionales de laboratorio.

Los estudios con priones se iniciaron en los años 60 en diversas estirpes de ratones de

laboratorio convencionales y en los 70 con hámsteres, pero debido a la barrera interespecie era difícil y costoso reproducir la enfermedad. Posteriormente, gran parte de la investigación en priones ha recaído en los ratones modificados genéticamente (Groschup y Buschnann, 2008).

## **RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

El gen de PrP o gen *PrnP* es un conjunto de nucleótidos que contienen la información necesaria para codificar a la proteína priónica. Este gen presenta una homología bastante marcada en los mamíferos; por ejemplo, en el caso mencionado anteriormente de los bóvidos y óvidos, la proteína priónica únicamente difiere en 7 aminoácidos.

Los ratones convencionales se denominan *PrnP<sup>+/+</sup>*, lo que significa que poseen y expresan el gen. Este gen se puede manipular, dando lugar a ratones considerados como organismos modificados genéticamente (OMG). Así se obtienen

- a) ratones knock-out, que no expresan el gen *PrnP* y que son resistentes a los priones,
- b) ratones transgénicos, que expresan el gen *PrnP* de otras especies en lugar del murino, y que, por lo tanto, son susceptibles a la infección con el prión de la cepa de esa especie animal.

Con estos modelos se ha comprobado que la barrera de especie en los priones se debe al gen *PrnP*, que es necesaria la PrP<sup>c</sup> normal para la “replicación” de la PrP<sup>res</sup>, que la susceptibilidad aumenta con la homología entre PrP<sup>res</sup> y PrP<sup>c</sup>, y que la n<sup>v</sup>ECJ procede de la EEB bovina.

### **Ratones knock-out o nulos**

Estos animales se han manipulado para eliminar el gen murino de la PrP (ratones *PrnP<sup>0/0</sup>* o *PrnP<sup>-/-</sup>*) y por tanto, no expresan la proteína PrP en las células. Son ratones que se desarrollan y se reproducen normalmente, lo que apoya los estudios que indican que la expresión fisiológica de la proteína es prescindible para el desarrollo y funcionamiento de las células de los mamíferos (Groschup y Buschnann, 2008). Sin embargo, en algunos experimentos en los que la eliminación del gen es más completa pueden aparecer problemas de comportamiento y de ataxia.

Posiblemente, el resultado más trascendente que se ha obtenido con este tipo de ratones es la demostración de que esta proteína es esencial para la replicación del prión infectante y el desarrollo de la EET. Weissmann y Flechsing (2003) inocularon ratones knock-out y *PrnP<sup>+/+</sup>* intracerebralmente con priones de scrapie adaptados a ratón. En los ratones *PrnP<sup>+/+</sup>* los síntomas clínicos comenzaron a partir del día 160 post infección (p.i.), muriendo 10 días

después. Sin embargo, los ratones *PrnP*<sup>-/-</sup> no presentaron sintomatología clínica durante al menos dos años y no habían desarrollado las patologías típicas producidas por scrapie antes de las 57 semanas p.i. En estos ratones knock-out no se propagaron los priones al cerebro y al bazo, mientras que en los ratones *PrnP*<sup>+/+</sup> los niveles de proteína prion en dichos órganos incrementan alrededor de 8,6 y 6,9 unidades LD<sub>50</sub>/ml, respectivamente a las 20 semanas p.i.

### **Ratones transgénicos**

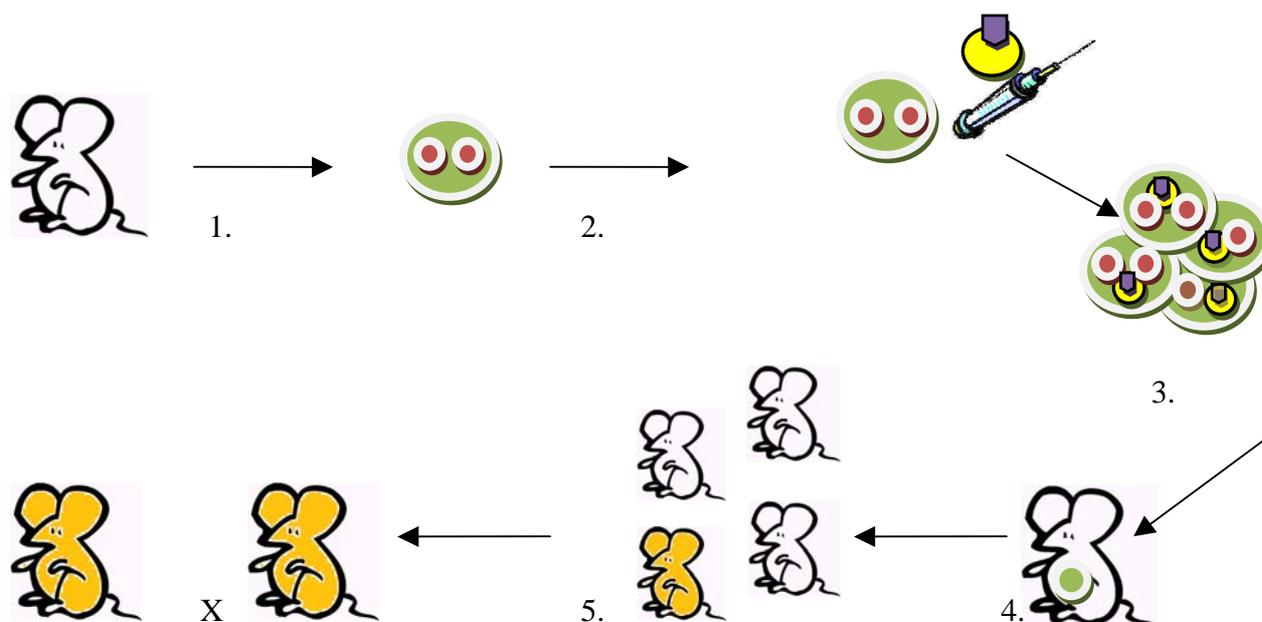
Estos ratones poseen un fragmento de ADN ajeno a su genoma, que ha sido introducido por manipulación genética. El primer paso consiste en construir un plásmido que posea el gen *PrnP* exógeno, tras lo que se introduce en la célula de estudio para que se inserte en el genoma. El gen añadido recibe el nombre de “transgen” y el animal portador del mismo se denomina transgénico. Se ha acordado utilizar una nomenclatura internacional, como, por ejemplo, Tg(BoPrnP), por la que Tg significa “transgénico” y Bo, que porta el gen *PrnP* bovino. Generalmente se emplean ratones knock-out para *PrnP* murina (*Prn*<sup>-/-</sup>) para que su propia proteína prión no interfiera en los estudios.

Existen dos métodos para generar ratones transgénicos:

- mediante una recombinación homóloga después de transferir a las células el gen de interés.
- por microinyección del plásmido que contiene el gen de interés en el interior del pronúcleo de un oocito de ratón (Groschup *et al.*, (2008) (Figura 1).

La técnica más empleada es esta última. Para que tenga un porcentaje de éxito aceptable se necesita seguir una serie de pasos:

1. Aplicación de la hormona estrogénica para que ovule la ratona y apareamiento con un macho, para extraer posteriormente los óvulos fecundados.
2. Inyección del plásmido con el gen de interés. Este proceso se repite en 10 a 20 óvulos.
3. Implantación de los embriones en una ratona pseudopreñada que anteriormente se ha apareado con un macho estéril.
4. Detección de los ratones transgénicos a partir del análisis de una muestra de tejido embrionario.
5. Cruzar entre sí los ratones transgénicos heterocigotos para obtener ratones homocigotos con dos copias del transgen.



**Figura 1:** Producción de un ratón transgénico.

Actualmente, existe una gran variedad de ratones transgénicos disponibles para el estudio de los priones propios de seres humanos, primates, bóvidos, óvidos, cápridos, cérvidos y visones.

Ya que los ratones transgénicos expresan el gen *PrnP* de otras especies en lugar del murino son susceptibles a la infección con el prión de la cepa de esa especie animal, y se considera que actúan como la misma especie de estudio, lo que ha posibilitado estudiar las distintas EETs. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los ratones transgénicos con el gen bovino (TgBoPrnP) son susceptibles a priones de EEB y de la nueva variante de ECJ, pero no a los priones procedentes de scrapie o de ECJ clásica. Además, los ratones TgBoPrnP inoculados con el prión de EEB o de nVEPJ presentan el patrón de lesiones y de vacuolización en el SNC propio de la EEB y el perfil electroforético por WB de los priones aislados de estos ratones es idéntico, y muy diferente a los del prión de scrapie y de ECJ clásica (Scott *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2005; revisado en Béringue *et al.*, 2008, Groschup y Buschmann, 2008). Así, se ha podido confirmar la relación existente entre EEB y la nVEPJ.

## CONCLUSIONES

Las EETs, además de su importancia en medicina veterinaria, tienen grandes repercusiones en la sociedad al considerar la EEB como una zoonosis, lo cual ha exigido a la comunidad científica a estudiar el agente causante de este grupo de enfermedades. Es difícil estudiar los priones con animales de gran tamaño como es el caso de las ovejas y las vacas y aún menos, hacer estudios con los seres humanos. De ahí la gran importancia que han tenido las nuevas

líneas de investigación que utilizan ratones transgénicos que expresan el gen de la PrP de otra especie animal y han permitido estudiar el comportamiento de los priones en animales de pequeño tamaño y fácil manejo que asemejan el comportamiento que tendrían en la especie hospedadora natural. Los diversos estudios llegan a la conclusión que, aunque es difícil saltar la barrera interespecie, sí es posible en los ratones transgénicos, y que depende además de la secuencia de la proteína priónica de la propia cepa de prión infectante. Esto se traduce en un acortamiento del período de incubación, o en una similitud de lesiones a nivel cerebral entre el hospedador natural y el animal inoculado. Con el estudio en ratones transgénicos se ha comprobado que existen más semejanzas entre los priones de EEB y nvECJ que con el de scrapie. Todos estos ensayos permiten a la comunidad científica abrir nuevos campos de investigación para conocer más a los priones a partir de líneas transgénicas utilizadas anteriormente y conseguir en un futuro un mejor control de las infecciones causadas por estas proteínas, tanto en animales como en los seres humanos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Béringue V., Vilotte J.L. y Laude H.** Prion agent diversity and species barrier. *Vet. Res.* (2008): 39:47.
- Bruce M.E.** TSE strain variation. *Br. Med. Bull.* 66 (2003): 99-108.
- Collinge J.** Prion disease of humans and animals, their causes and molecular basis. *Ann. Rev. Neuroscience* 24 (2001): 519-550.
- Groschup M. H. y Buschmann A.** Rodent models for prion diseases. *Vet. Res.* 39 (2008): 32
- Scott M. R., Will R., Ironside J., Nguyen H-O. B., Tremblay P., DeArmond S. J. y Prusiner S. B.** Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *PNAS* 96 (1999): 15137-15142.
- Scott M. R., Peretz D., Nguyen H-O. B., DeArmond S. J. y Prusiner S. B.** Transmission barriers for bovine, ovine and human prions in transgenic mice. *J. Virol.* 79 (2005): 5259-5271.
- Vorberb I., Groschup M. H., Pfaff E. y Priola S. A.** Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform. *J. Virol.* 77 (2003): 2003-2009.
- Weissmann C., y Flechsig E.** PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br. Med. Bull.* 66 (2003):43-60.