

Encefalopatie spongiformi trasmissibili (Malattie da prioni)

Sono malattie rare con un'incidenza di 1 su 800 mila soggetti, sono malattie sempre esistite ed inquadrata per la prima volta, nell'uomo, da due studiosi tedeschi: Creutzfeldt e Jacob.

Non sono malattie esclusive dell'uomo ma anche degli animali.

→ Malattie dell'animale:

- Scrapie (pecora e capra)
- Encefalopatia trasmissibile del visone
- Malattia cachettica del daino e dell'alce
- Encefalopatia spongiforme bovina (ESB)
- Encefalopatia spongiforme felina

→ Malattie umane:

- Kuru (ormai scomparso)
- Malattia di Creutzfeldt-Jacob sporadica (C-J) → → 85%
- Malattia di Creutzfeldt-Jacob familiare
- Malattia di Gerstmann-Strauser-Sheinker (GSS) 15%
- Insonnia fatale familiare
- Malattia di Creutzfeldt-Jacob iatrogena o trasmissibile
- Nuova variante della Creutzfeldt-Jacob

Quindi sono malattie dell'uomo e dell'animale, soprattutto di questi ultimi un esempio è lo *scrapie*, malattia della pecora e della capra probabilmente conosciuta da 200 anni.

→ Scrapie significa "grattarsi" infatti gli animali affetti da tale patologia hanno la tendenza a strusciarsi dovunque possono (rami, alberi), da qui il nome scrapie.

Sono malattie rapidamente evolutive (nel giro di giorni o settimane) che portano inevitabilmente a morte; non possiamo salvare nessun uomo affetto da malattia di C-J perché è una malattia inesorabilmente fatale.

→ Encefalopatia spongiforme bovina (ESB o BSE), invece, non è una malattia da sempre esistita come lo scrapie; le prime definizioni si sono avute nel 1996 periodo in cui era nota come "mucca pazza".

Nel 1996, infatti, in Inghilterra sono stati osservati i primi casi di uomini affetti dalla forma umana della ESB conseguente all'ingestione di carne di mucca malata.

→ Dopo l'ESB è comparsa anche l'encefalopatia spongiforme felina patologia esclusivamente degli zoo.

N.B. Nella mucca esistono due varianti:

- BSE che presenta caratteristiche neuropatologiche e di Western-Blotting simili a quella della nuova variante della malattia di C-J
- BASE che presenta caratteristiche neuropatologiche molto simili a quelle della forma sporadica della malattia di C-J

Per quanto riguarda le forme umane queste sono malattie che presentano una caratteristica fondamentale ovvero quelle di essere sia:

- Sporadiche (più frequenti 85% dei casi)
- Ereditarie (meno frequenti 15% dei casi, esse sono legate a mutazione di qualche gene e che da un punto di vista clinico si presentano con fenotipi diversi e per questo hanno nomi diversi).

N.B. Esempi di malattie che possono essere sia sporadiche che ereditarie sono:

- Demenza fronto-temporale: la cui forma familiare è legata ad alterazioni del gene della proteina tau;
- Parkinson: le cui forme familiari sono legate ad alterazione di due geni che codificano rispettivamente per la parkina (cromosoma 6) e per l' α -sinucleina (cromosoma 4);
- ecc.
- Trasmissibili o iatrogene (se prendiamo un omogenato cerebrale di un uomo affetto da malattia da prioni e lo inoculiamo in una scimmia questa muore da malattia da prioni).

Analizziamo ora le forme dell'uomo:

→ Malattia di Creutzfeldt-Jacob è una malattia rapidamente evolutiva caratterizzata prevalentemente da atassia e mioclonie;

→ Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) che è una forma sempre familiare (dovuta ad alterazione differente dello stesso gene) di un'atassia lentamente evolutiva.

Spesso questi pz affetti da GSS vengono considerati in maniera impropria come atassici cerebellari o spino cerebellari (gruppo di malattie che coinvolge solo il sistema di moto spino-cerebellare in cui c'è sostanzialmente perdita dell'equilibrio, si parla di atassie degenerative).

E' importante, dunque, fare la diagnosi differenziale con le atassie degenerative ma anche con la sclerosi multipla, malattia ad andamento cronico-progressivo a prevalente coinvolgimento atasso-spastico (quindi del sistema piramidale, extrapiramidale e del sistema dell'equilibrio).

Invece la diagnosi differenziale con la C-J è fatta soprattutto sulla base della rapidità con cui evolve il quadro clinico.

- Malattia di Creutzfeldt-Jacob iatrogena è un'altra forma di malattia da prioni che può essere nella maggior parte dei casi conseguente all'utilizzo di ormone della crescita estrattivo (terapia ormonale sostitutiva)
- Nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jacob forma patologica recente che origina dalla contaminazione con materiale bovino affetto da encefalopatia spongiforme bovina.
- Kuru forma endemica di malattia da prioni tipica della popolazione Fore della Nuova Guinea dovuta ad atti di cannibalismo rituale cioè gli abitanti si cibavano del cervello di familiari defunti (soprattutto della nonna, poiché si trattava di una società prevalentemente di tipo matriarcale in cui la nonna aveva una grande importanza e al momento della sua morte il cadavere veniva mangiato dai suoi familiari, soprattutto donne e bambini che mangiavano in particolare il cervello per acquisire saggezza, bontà, bellezza, intelligenza e l'aura).
 Alla fine degli anni '70 l'80% della popolazione (cioè tutti, soprattutto i bambini) moriva di kuru, patologia estremamente atassica con demenza (erano dementi felici) che però evolve in coma → exitus.
 Inizialmente si pensava fosse dovuta ad un virus dementigeno (lentivirus) con tempi di incubazione variabili finché Breslow (veterinario) scrisse una pubblicazione sulla trasmissione dello scrapie da pecora a pecora; tale pubblicazione fu letta da altri studiosi i quali verificarono che questa malattia era trasmissibile senza acidi nucleici (a tale conclusione si giunse attraverso l'inoculo di omogeneizzato di cervello malato in scimmie sane, con risultato un 'encefalopatia letale).
 Conclusione dei vari studi fu che tali malattie (kuru, scrapie, malattia di C-J) oltre ad essere trasmissibili presentavano le stesse stimate dal punto di vista neuropatologico ovvero presentavano una spongiosi dell'encefalo cioè il cervello si presentava come un formaggio svizzero o come una spugna con numerosi microbuchi nella corteccia (per questo si parla di encefalopatie spongiformi)

Dunque la trasmissione interumana può avvenire mediante:

- Trapianto di dura madre
- Strumenti inadeguatamente sterilizzati
- Elettrodi stereotassici (cioè elettroencefalografici profondi)
- Trapianti di cornea
- Ormone della crescita e gonadotropine umane
- Trasmissione di kuru attraverso cannibalismo rituale
- Possibile esposizione alla ESB

Escluso il trapianto di cornea la trasmissione può avvenire mediante tutto ciò che abbia avuto contatto con la sostanza incriminata.

corticale cioè i soggetti hanno un'alterazione della capacità visiva, ad esempio hanno un'alterazione della capacità di riconoscimento tridimensionale degli oggetti, della profondità, dell'organizzazione spaziale cioè hanno un'alterazione della corteccia associativa visiva ovvero quella che ci permette l'integrazione cognitiva di ciò che vediamo.

Diagnosi:

Dal punto di vista clinico elementi che potrebbero indurre il sospetto di una malattia di C-J sono:

- rapido coinvolgimento delle funzioni cognitive (rapida demenza)
- mioclonie

ci sono però degli ausili da poter utilizzare per fare diagnosi, nello specifico si parla di *diagnosi di probabilità*.

Per le malattie degenerative, infatti, la diagnosi può essere solo di probabilità in quanto la *diagnosi di certezza* in tali malattie è solo neuropatologica ovvero mediante autopsia o biopsia.

Gli ausili sono:

- EEG → ci permette di osservare un'attività cerebrale disregolata, rallentata, non strutturata, non sincronizzata.
Il tracciato presenta delle caratteristiche *onde lente trifasiche pseudoperiodiche* (perché sembra che si ripetono con lo stesso periodo ma in realtà si ripetono ogni 1-2 periodi) in genere *diffuse*.
- RM → mostra un'*iperintensità* dei nuclei della base in particolare nucleo caudato e putamen (appaiono più bianchi, più brillanti) nelle sequenze T2, FLAIR e diffusion.
Nella nuova variante della malattia di C-J l'iperintensità appare al pulvinar (talamo)
- Esame del liquor → andiamo a cercare la proteina 14.3.3
Questa proteina è normalmente presente nei neuroni e non nel liquido. Compare infatti nel liquor di soggetti affetti
 - da grave distruzione cerebrale (ischemia cerebrale)
 - da grave degenerazione rapida cerebrale
 quindi la proteina 14.3.3 è una proteina citoplasmatica neuronale che qualora compare nel liquor è indice di citolisi neuronale.
Questo è caratteristico ma non patognomonico della malattia di C-J in quanto tale proteina può essere aumentata anche in caso di meningite o encefalite (condizioni che danno una demenza reversibile, ecco perché è importante fare diagnosi differenziale con la malattia di C-J responsabile, invece, di una demenza irreversibile).

Markers anatomopatologici fondamentali della malattia sono:

- spongiosi della corteccia
- immunoistochimica: anticorpi monoclonali diretti contro la proteina malata (che appare scura, marrone)
- immunoblotting: dimostra una resistenza della proteina “cattiva” alla proteinasi K (una proteina che normalmente distrugge le proteine) per cui il peso molecolare di tale proteina shifta perché viene digerita solo in parte.

Aree in cui più frequentemente si deposita la proteina malata sono:

- testa del caudato, putamen, claustrum, insula
- talamo, ipotalamo
- ippocampo
- corteccia (frontale, parietale, occipitale, temporale)
- cervelletto

Pattern di distribuzione della proteina

(cioè come si distribuisce la proteina in tali aree)

- diffuso
- focale-perivascolare
- focale-perineuronale
- a placche come nella malattia di Alzheimer)

Dunque l'eterogeneità delle malattie da prioni dal punto di vista clinico corrisponde ad un'eterogeneità di tipo neuropatologico.

MALATTIA DI GERSTMANN-STRAUSER-SHEINKER (GSS)

Malattia sempre ereditaria caratterizzata da atassia cerebellare lentamente evolutiva (può durare anche 11 anni).

Solo nelle ultime fasi della malattia compare un'encefalopatia diffusa, allora questi pz divengono dementi, vanno in coma e poi muoiono.

INSONNIA FATALE FAMILIARE (FFI)

Caratterizzata da un'insonnia incoercibile (all'EEG si evidenzia che al massimo riescono a raggiungere la fase 1 del sonno) associata spesso a segni disautonomici e segni disendocrini aspecifici (probabilmente disendocrinopatia ipotalamica).

GSS e FFI non hanno quasi mai alterazioni dell' EEG e della RM; solo nella GSS ci può essere un'alterazione del segnale cerebellare.

Aspetti biomolecolari

Le malattie da prioni sono malattie rare, trasmissibili e quindi infettive ma a differenza di queste ultime della trasmissione è responsabile una proteina e non gli acidi nucleici, ciò né stato confermato da importanti evidenze sperimentali:

- se prendiamo il cervello di un topolino affetto da encefalopatia, lo omogeneamo e lo inoculiamo nel cervello di un topolino sano questo in breve tempo si ammala della stessa malattia, diviene demente e muore.
- Se prendiamo l'omogenato cerebrale infetto, lo sottoponiamo in laboratorio a procedure che inattivano qualsiasi acido nucleico (come i raggi UV), e poi lo inoculiamo in un topolino sano questo si ammala.
- Se prendiamo, invece, l'omogenato cerebrale infetto e lo sottoponiamo a metodiche di denaturazione delle proteine (e non a raggi UV), il topolino ricevente l'inoculo infetto sottoposto a denaturazione non si ammala. Questa è l'evidenza più ovvia che per la trasmissione della malattia non è necessario l'acido nucleico ma è indispensabile la proteina → → →
→ la proteina prionica PrP

La proteina prionica è normalmente codificata da un gene localizzato sul cromosoma 20; è una sialoglicoproteina di membrana altamente conservata nei mammiferi, costitutivamente espressa in tutti i tessuti, soprattutto nel cervello. La sua funzione fisiologica non è chiara ma probabilmente è:

- proteina sinaptica implicata nella trasmissione GABAergica
- implicata nella sopravvivenza a lungo termine delle cellule del Purkinje
- implicata nella regolazione de ritmo sonno-veglia
- una parte della proteina è simile nella struttura alla SOD - superossidodismutasi- (Cu-Zn binding site) quindi agirebbe nella pulizia della cellula dai radicali liberi dell'ossigeno.

E' certo che:

→ topi transgenici PrP^{null} (cioè topi normali che però non hanno la proteina prionica) si sviluppano normalmente e sono resistenti alla trasmissione della malattia

→ la reintroduzione del gene della PrP ristabilisce la suscettibilità ad ammalarsi

Per cui per la trasmissione non servono acidi nucleici ma proteine, la PrP, e soprattutto è fondamentale che la proteina sia espressa nell'ospite.

Se mettiamo a confronto la PrP di un soggetto sano (PrPc) con quella del cervello di un soggetto morto per malattia di C-J (PrPsc) queste risultano essere uguali cioè hanno lo/a stesso/a:

- peso molecolare
- sequenza aminoacidica
- ancora GPI
- catene glicidiche legate ai residui 181 e 197
- lunghezza

solo che la PrPc:

- non è associata a malattia di C-J
- non è associata all'infettività
- è completamente digerita dalla protein Kinasi
- 3% foglietto β
- 42% α -elica

La PrPsc invece:

- È associata alla malattia di C-J
- È associata all'infettività
- È resistente alla protein kinasi con produzione di un frammento di 27-30 KD con medesima capacità infettiva.
- Tende ad assemblarsi in strutture ROD-LIKE quando esposte a detergenti; per strutture rod-like si intende strutture ordinate che si impacchettano l'una sull'altra a formare strutture sferiche di tipo amiloideo dette placche le quali presentano al congo rosso una caratteristica birifrangenza
- 43% di foglietto β (maggiore quantità)
- 30% α -elica

Dunque ciò che le differenzia è la struttura secondaria, l'organizzazione tridimensionale della proteina che è responsabile della funzione.

Dunque alla base c'è una mutazione che determina la sostituzione di uno o più aminoacidi che porta ad un cambiamento della struttura della proteina.

Nella forma sporadica la mutazione della proteina è casuale, probabilmente conseguente ad un errore cellulare come l'errata attività delle chaperonine (forse mutate) del reticolo endocellulare che sbagliano ad impacchettare la proteina.

Nella forma familiare la mutazione della proteina è conseguente a mutazione di geni che codificano per quelle regioni della proteina deputata alla formazione dell' α -elica, quindi $\rightarrow \rightarrow$ trasformazione dell' α -elica in β -foglietto.

Un altro concetto molto importante è il polimorfismo metionina/valina al codone 129 del gene per la proteina prionica che condiziona il fenotipo clinico delle malattie, cioè al codone 129 ci può essere Met-Met, Met-Val, Val-Val.

- ✚ Se si ha mutazione 178 associata sullo stesso filamento di DNA alla Met al codone 129 → **Insonnia fatale familiare**
- ✚ Se si ha mut 178 associata a Val al codone 129 → **malattia di C-J**
- ✚ Se si ha mut 102 associata a Met al codone 129 → **GSS con atassia e demenza**
- ✚ Se si ha mut 102 associata a Val 129 → **GSS con paraparesi spastica**

Ciò indica che il codone 129 è un punto chiave nella trasformazione della proteina e che esistono più conformazioni patologiche della proteina prionica ciascuna responsabile di un particolare fenotipo.

Parliamo ora della trasmissione.

Domande che insorgono spontaneamente sono:

1. come può la proteina malata determinare malattia?
2. se metto la proteina malata nel cervello di un soggetto sano perché questi si ammala?

Si sa che la proteina prionica patologica PrP^{sc} ha la capacità intrinseca di legarsi alla proteina analoga dell'ospite e convertirla a sua immagine e somiglianza.

Ciò spiega perché la pecora non ha mai trasmesso nulla all'uomo.

Evidentemente la proteina prionica della pecora ha incontrato quella del nostro cervello ma non è riuscita a legarsi ad essa e questo perché, per la differenza evolutiva, tra la nostra PrP e quella della pecora non c'è omologia di sequenza cosa che invece c'è tra la nostra PrP e quella della mucca.

La mucca presenta una PrP con sequenza aminoacidica che differisce da quella della pecora solo 8-9 aa, e da quella dell'uomo 8aa.

La differenza della sequenza della PrP fra uomo e pecora è, invece, di 22 aa → si parla in questo caso di **barriera di specie** cioè fra una specie ed un'altra ci sono delle differenze.

Ecco perché la pecora può infettare la mucca e questa l'uomo ma la pecora non può infettare direttamente l'uomo.

Barriera di specie:

- ✚ Esiste, dunque una barriera alla trasmissione dell'infettività dovuta alla differente sequenza aminoacidica tra la PrP^{sc} (patologica) del donatore e quella sana dell'ospite (PrP^c).
- ✚ La formazione di un eterodimero PrP^{sc}/PrP^c rappresenta lo step intermedio nella formazione della nascente PrP^{sc}.
- ✚ Il 100% dell'omologia tra PrP^{sc} del donatore e la PrP^c dell'ospite non è sufficiente a sostenere il processo di conversione e propagazione del prione.
- ✚ L'eterodimero PrP^{sc}/PrP^c non è sufficiente da solo alla conversione della PrP^c.
- ✚ La riuscita del processo necessita della partecipazione attiva di un fattore cellulare che riconosce alcuni residui della PrP^c dell'ospite →
→ "la proteina X"

**Ricapitolando l'evento molecolare chiave delle malattie da prioni è
la conversione di PrPc in PrPsc**

tale evento è:

- casuale o dovuto a mutazione somatica nella forma sporadica
- indotto da PrPsc esogena nella forma iatrogena o trasmessa
- conseguenza dell'instabilità della PrP mutata nella forma familiare

NUOVA VARIANTE DELLA MALATTIA DI C-J

Differisce dalla forma classica per l'età media d'esordio nettamente inferiore intorno ai 28 anni, colpisce soprattutto i giovani.

La durata della malattia è maggiore, circa 3 anni perché più lenta.

La sintomatologia è diversa, non ci sono mioclonie bensì un esordio psichiatrico associato anche a parestesie degli arti inferiori.

- + EEG: assenza delle tipiche alterazioni
- + RM: iniziale e prevalente coinvolgimento del pulvinar talamico
- + GENETICA: no mutazioni e omozigosi Met-Met al codone 129 in tutti i casi segnalati (non c'è nessuna omozigosi Val-Val né eterozigoti Met-Val)
- + NEUROPATOLOGIA: peculiare pattern lesionale → placche floride con spongiosi circostante
- + BIOCHIMICA: peculiare pattern elettroforetico della PrP estratta dal tessuto cerebrale

Quello che si sa con certezza è che questa proteina prende due strade:

1. nervosa attraverso le terminazioni del plesso mioenterico raggiunge direttamente il midollo spinale
2. reticolo-istiocitaria cioè attraverso le cellule del sangue staziona ai linfonodi o organi linfatici per questo in questi casi la diagnosi può essere effettuata ricercando la proteina a livello delle tonsille palatine anche se, nel sospetto di nuova variante di C-J, è d'obbligo la biopsia per la diagnosi di certezza.

Di Costanzo Marianne