

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

124

CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS O-GLICOSILADOS EN LOS DEPÓSITOS DE LA PROTEÍNA PRION EN LA ENFERMEDAD DE GERSTMANN-STRAÜSSLER-SCHEINKER

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

SARAÍ MONTES RECINAS

DIRECTOR DE TESIS MIGUEL ANGEL JORGE GUEVARA FONSECA

ESTUDIOS PROFESIONALES

2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
 DE INGENIERÍA
 AV. ZURUTUEN
 15123

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **Caracterización de residuos O-glicosilados en los depósitos de la proteína prion en la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.**

realizado por **Saraí Montes Recinas**

con número de cuenta **9238063-3**, quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario **Dr. Miguel Angel Jorge Guevara Fonseca**

Propietario **Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera**

Propietario **M. en C. Marco Antonio Martínez Avila**

Suplente **M. en C. Alma Ortiz Plata**

Suplente **Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo**

[Handwritten signatures and initials: "Montes", "Alfonso", "Martínez", "Ortiz", "Zenteno"]

**FACULTAD DE CIENCIAS
 U.N.I.A.M.**

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



**DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGÍA**

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Patología y de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez. Av. Insurgentes Sur N° 3877, Col. La Fama, Del. Tlalpan, C.P. 14269 México, D.F. México.

Con el apoyo de CONACYT (G38590N). Programa de investigación estratégica en salud SS-CONACYT 2000 y DGAPA - UNAM (PAPIIT-IN207901).

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. M. A. Jorge Guevara Fonseca por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su asesoría y apoyo.

A los sinodales por el tiempo otorgado a la revisión de esta tesis y por sus constructivos comentarios:

Dr. Edgar A. Zenteno Galindo
Biol. José Alfonso Vilchis Peluyera
M. en C. Alma Ortiz Plata
M. en C. Marco Antonio Martínez

Especialmente al Dr. Edgar A. Zenteno por su interés y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A Profa. Biol. Aida G. Guzmán López por su ayuda y asesoría.

Al Dr. Daniel Rembao Bojórquez por las facilidades otorgadas

A todos los integrantes de los laboratorios de Patología y de Enfermedades Neurodegenerativas por su cordialidad y ayuda, especialmente:

M. en C. Alma Ortiz Plata, Biol. Aurora Sánchez García, Biol. Francisca Fernández Valverde, Biol. Concepción Nava Ruiz, Sra. María Teresa Uribe Navarro, Biol. Minerva Calvillo Velasco y Dra. Juanita Villeda Hernández.

A Carlos Sandoval Jaimes por su compañerismo.

DEDICATORIAS

A mi padre por su apoyo

A mi madre por su confianza, cuidados y enseñanzas

A mi hermano por su presencia

A mis hermanas por su compañía

A mi sobrina por su llegada a este mundo

A mi abuelita por su cariño

A Leonardo por su amistad, por su ayuda y por sus palabras de aliento

Sin Dios ni Razón ni Estado que justifiquen de modo absoluto e inapelable los valores, la búsqueda del sentido de la acción se convierte en una aventura personal y problemática, llena de contradicciones de opciones casi intuitivas y de desgarramientos; en una palabras se convierte en una peripecia *heroica*.

Fernando Savater
El contenido de la felicidad

"Si no somos una unidad, si sólo tenemos un ser exterior, si sólo somos un número en la masa o una fracción en la confusión de las cosas, ¿Cómo descubriremos la verdad?"

Seren Kierkegaard

**CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS O-GLICOSILADOS EN LOS DEPÓSITOS DE
LA PROTEÍNA PRION EN LA ENFERMEDAD DE GERSTMANN-STRÄUSSLER-
SCHEINKER.**

	<i>Pag.</i>
RESUMEN	3
I. - INTRODUCCIÓN	4
1. - Enfermedades causadas por priones (EPRs)	4
1.1.- EPRs en humanos:	4
1.2 - EPRs de animales	8
2. - Neuropatología de las EPRs	10
3. - Neuropatología del síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	11
4. - Transmisión de las EPRs	12
5. - Naturaleza molecular de la PrP^C	14
6. - Posible función de la PrP^C como receptor de Cu²⁺	16
7. - Propiedades de las isoformas PrP^C y PrP^{Sc}	17
8. - Teorías del cambio conformacional de la PrP^C	18
9. - Glicosilación	21
10. - Glicosilación de la PrP^C	23
11. - Lectinas	25
II. - ANTECEDENTES	26
III. - JUSTIFICACIÓN	27
IV. - OBJETIVOS	28
V. - HIPÓTESIS	28
VI. - MATERIAL Y MÉTODOS	28
VII. - RESULTADOS	37
VIII. - DISCUSIÓN	45
ANEXOS	51
REFERENCIAS	53

ABREVIATURAS

AG	Aparato de Golgi
EPRs	Enfermedades por priones
EETs	Encefalopatías espongiformes transmisibles
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
EEB	Encefalopatía espongiforme bovina
nvECJ	Nueva variante de ECJ
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker
IFF	Insomnio fatal familiar
Prion	Partícula proteica infecciosa (<i>proteinaceous infectious</i>)
PrP	Proteína prion
PrP ^c	Proteína prion celular
PrP ^{sc}	Proteína prion scrapie
PRNP	Gen de la proteína prion
RE	Reticulo endoplásmico

GLOSARIO

Ataxia.- (del gr. *Ataxía*, de *átaktos*; de *a-*, priv., y *tásssein*, ordenar). Trastorno del movimiento voluntario, que aparece incoordinado, estando conservada la fuerza muscular.

Autosómico.- Dícese del gen, alelo o carácter localizado en cromosomas no sexuales.

Disartría.- (de *dis-* y el gr. *árrhron*, articulación). Trastorno en la articulación del lenguaje debido a lesiones orgánicas en los núcleos o vías del sistema nervioso central.

Dismetría.- (de *dis-* y el gr. *métrom*, medida). Apreciación incorrecta de la distancia en los movimientos o actos musculares.

Hipotonía.- (de *hipo-* y el gr. *tónos*, tensión). Tensión o tonicidad disminuida, especialmente de los músculos.

Mioclónías.- Contracción brusca, breve e involuntaria, que afectan un fascículo muscular, un músculo o grupo de músculos.

Paparésis.- (del gr. *páresis*, debilitamiento). Debilitamiento de los miembros inferiores.

RESUMEN

La enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) forma parte de las enfermedades por priones (EPRs), antes denominadas encefalopatías espongiiformes transmisibles (EETs). El agente infeccioso de las EPRs es una proteína alterada conformacionalmente, la proteína prion (PrP). La PrP posee dos isoformas, la normal o celular (PrP^c), de la que se desconoce su función, y la infecciosa. El término prion es generalmente aplicado a la forma infecciosa, también denominada proteína prion scrapie (PrP^{sc}). La conformación de la PrP^{sc} se distingue por un alto contenido de estructura lámina β -plegada (43%); a diferencia del confómero normal, del que procede, que posee sólo 3%. La PrP^{sc} es típicamente insoluble y parcialmente resistente a proteasas, se acumula en el Sistema Nervioso Central formando depósitos que histopatológicamente se observan como placas, con propiedades tintoriales de amiloide. Otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer también poseen depósitos amiloides en forma de placas, en este caso de la proteína amiloide- β . Asociados a estos se han encontrado carbohidratos O-glicosilados. La adición de carbohidratos puede transformar radicalmente la conformación y propiedades de una proteína, por lo que la presencia de los O-glicanos sugiere su participación en la agregación de la proteína amiloide- β . El objetivo de este trabajo fue el determinar la presencia de O-glicanos en las placas amiloides de PrP^{sc} en el síndrome de GSS. Fue utilizado tejido cerebelar de un caso con GSS, diagnosticado molecularmente (P102L), y como controles tejido cerebelar de pacientes sanos y con la enfermedad de Alzheimer. Para un reconocimiento de las características tintoriales de los depósitos de la PrP^{sc} fueron aplicadas las técnicas histológicas H y E, azul de toluidina e impregnación argéntica, para localizar los depósitos de la proteína PrP^{sc}, fue aplicada la técnica inmunohistoquímica anti-PrP^{sc} y para determinar la presencia y naturaleza de carbohidratos la técnica histoquímica con lectinas. Las lectinas utilizadas provienen de: *Maackia amurensis* (MAA), *Amaranthus leucocarpus* (ALL), *Limulus polyphemus* (LPA), *Arachis hypogea* (PNA), *Sambucus nigra* (SNA) y *Macrobranchium rosenbergii* (MRL). En los depósitos en placa de la PrP^{sc} fue observado un reconocimiento positivo de los carbohidratos reconocidos con las lectinas MAA [Neu5Ac α 2,3], ALL [Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr y GalNAc α 1,0Ser/Thr], LPA [Neu5Ac], PNA [Gal- β 1,3-GalNAc] y SNA [Neu5Ac α -2,6 Gal/Gal NAc], y ausencia de reconocimiento con MRL [Neu5,9Ac2]. La presencia anormal de estos carbohidratos indica que existen alteraciones en las enzimas que llevan a cabo el proceso de O-glicosilación, enzimas que se encuentran en el aparato de Golgi. Un doble marcaje con lectinas y el anticuerpo anti-PrP^{sc} para cpnfocal nos permitió observar colocalización entre las lectinas MAA, ALL, SNA, LPA y PNA con el anticuerpo anti-PrP^{sc}, en los vasos sanguíneos, y con solo MAA en los depósitos en forma de placas, lo que sugiere distintos mecanismos de formación de los depósitos de la PrP^{sc}, en los vasos sanguíneos en estrecha asociación con las moléculas de la PrP^{sc} y en los depósitos en forma de placas posiblemente como componentes de otras moléculas. Este último resultado sugiere que residuos O-glicosilados reconocidos con distintas lectinas podrían pertenecer a otras moléculas, a su vez asociadas a la PrP^{sc}, la naturaleza de estas moléculas podrían residir en las chaperonas moleculares, grupo dentro del cual se ha sugerido la identidad de la molécula que puede mediar en el cambio conformacional de la proteína prion.

I.-INTRODUCCIÓN

1.- Enfermedades por priones (EPRs)

La enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker es un padecimiento que forma parte de las enfermedades por priones, o prionopatías, antes conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs). Las EPRs son enfermedades neurodegenerativas, progresivas e invariablemente fatales, que afectan tanto a humanos como a animales (Balanzat, 1998; Belay, 1999; Weissmann, 1999). Estos padecimientos presentan tiempos de incubación variables que van de meses, años y ocasionalmente décadas (Bendheim y cols., 1985).

Las EETs son patologías sin precedente, tanto por sus formas variadas de transmisión y manifestación, a saber: hereditaria, esporádica e infecciosa (Milhavel y cols., 2000), como por la naturaleza de lo que hasta el momento se considera su principal agente infeccioso; una proteína del propio organismo alterada conformacionalmente, la proteína prion (Prusiner, 1995; Balanzat, 1998; Belay, 1999). Las variantes hereditarias de las EPRs se deben a la mutación del gen que codifica para la proteína prion (PRNP) (Cohen, 1999). Las mutaciones en este gen pueden resultar en la sustitución de un codón por otro (inserciones puntuales) o en la inserción de repeticiones de un codón en múltiplos de ocho (ver pag. 15). La causa de las formas esporádicas se desconoce. Las prionopatías por infección pueden deberse a: ingestión, transplantes de órganos o inoculación intracerebral, de tejido nervioso que contenga la proteína prion en su forma infecciosa (Balanzat, 1998).

1.1.- EPRs en humanos

En los humanos, las enfermedades causadas por priones provocan, de manera general: pérdida del control motor, pérdida de la capacidad cognoscitiva y demencia

progresiva (Belay, 1999). En este tipo de padecimientos se incluyen: la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), el insomnio familiar fatal (IFF), la angiopatía amiloide por priones (AAC-PrP), el Kuru, una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvECJ) y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) (Baker y Ridley, 1996; Guetti y cols., 1996a; Weissmann, 1999) Tabla 1.

EETs	Etiología	Promedios de inicio y duración de la enfermedad	Síntomas	Epidemiología
ECJ	Un 10-15% es hereditaria. El resto esporádica y raramente por infección	Inicio: 70 años Duración: alrededor de 1 año	Ataxia, mioclonias y demencia. En un tercio de los casos se presenta fatiga, insomnio, depresión y malestar general.	Esporádica: 1 persona por un millón, en todo el mundo. Hereditaria: se han detectado \pm 100 familias Infecciosa: \pm 80 casos
Kuru	Infecciosa, por canibalismo, que cesó en 1958	Inicio: Variable Duración: de tres meses a 1 año	Pérdida de coordinación, dismetría, hipotonía, disartría, labilidad emocional, seguido a menudo de demencia.	Sólo se ha presentado en Papúa Nueva Guinea, en 1957 fueron reportados 2600 casos.
IFF	Hereditaria, por una mutación en el gen PRNP y esporádica	Inicio: 48 años Duración: alrededor de 1 año	Trastornos progresivos del sueño, pérdida de independencia funcional, trastornos endócrinos y motores.	Se han identificado 9 familias
AAC-PrP	Hereditaria, por una mutación en el gen PRNP	Inicio: 38 años Duración: 21 años	Disturbios de memoria, desorientación, ataxia, parálisis ligera-espasmódica y demencia.	1 caso
GSS	Hereditaria, por una mutación en el gen PRNP	Inicio: 40-60 años Duración: 1 a 16 años	Ataxia, demencia cortical global, mioclonias, parálisis ligeras y/o espasmódica agitantes.	2 casos por 100 millones. Se han identificado \pm 50 familias
nvECJ	Infecciosa	Inicio: 28 años Duración: alrededor de 1 año	Cambios en el carácter; ansiedad, depresión, ataxia y demencia tardía.	Hasta 1999, 38 casos confirmados

Tabla 1. Enfermedades por priones en el humano.

La *enfermedad de Creutzfeldt-Jakob* (ECJ) fue la primera EETs descrita en humanos, por H.G Creutzfeld y A. Jacob en la década de los 20's (Richardson y Masters, 1995). En la ECJ la mayoría de los casos aparecen esporádicamente y afecta a una persona por un millón, presentándose alrededor de los 70 años de edad (Weissmann, 1999). En un 10 a 15% de los casos es hereditaria, con un patrón

autosómico dominante relacionado con alguna mutación en los codones: 200, 210, 178 o a inserciones octapeptídicas con penetrancia variable (Prusiner, 1995; Balanzat, 1998). En un porcentaje muy inferior (*tabla 1*) es iatrogénica, transmitida por: trasplante de córnea, implantes de dura madre o electrodos en el cerebro, utilización de instrumentos quirúrgicos contaminados e inyección de la hormona del crecimiento obtenida a partir de glándula hipofisaria de humanos infectados (antes de que se contara con la versión sintética de la somatotropina) (Prusiner, 1995; Balanzat, 1998).

En 1957, C.D. Gajdusek y V. Zigas reportaron la enfermedad denominada "Kuru" o "muerte de la risa" en la tribu Foré de Papúa, Nueva Guinea (Gajdusek y Zigas, 1957; Prusiner, 1995). La palabra "Kuru" significa, en el lenguaje de esta tribu, temblar o titiritar por fiebre o frío. Los Foré la usaron para describir la plaga letal, definida por ataxia, que a menudo acababa en demencia. Los individuos afectados adquirían el "kuru" a través de una práctica de canibalismo ritual. La tribu Foré honraba a sus muertos consumiendo su cerebro y extremidades (Gajdusek, 1977; Liberski y Gajdusek, 1997).

Insomnio Familiar Fatal (IFF): Pacientes con demencia y degeneración bilateral del tálamo fueron reportados desde 1939, pero no fue sino hasta 1986 cuando E. Lugarest, R. Medori y P. Gambeti acuñaron el nombre de esta enfermedad (Prusiner, 1995; Belay, 1999). Se trata de una enfermedad caracterizada por trastornos progresivos del sueño, pérdida de independencia funcional, trastornos endócrinos y motores, que desembocan en la muerte tras un periodo medio de 13 meses. Su edad media de comienzo es de 48 años. La mayoría de los casos son familiares y se asocian a mutaciones del PRNP, en el codon 178 (D178N), con lo que se intercambia ácido aspártico por asparagina

(Balanzat, 1998). Aunque son raros los casos esporádicos estos se asocian al polimorfismo del codón 129 del PRNP (Golfarb y cols., 1992).

Angiopatia Amiloide Cerebral por Priones (AAC-PrP). La angiopatía amiloide cerebral por priones es el nombre otorgado a un nuevo fenotipo de la enfermedad de GSS, caracterizado por demencia. Se asocia a una mutación en el PRNP en el codón 145: (TAT→TAG; Y→stop), la cual resulta en un cambio de una tirosina por un codón de paro provocando terminación prematura de la PrP^c. Se distingue de otras EPRs por presentar histopatológicamente abundantes lesiones neurofibrilares que están compuestas por la proteína tau fosforilada, similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer (Kitamoto 1993; Guetti y cols., 1996a; Guetti y cols., 1996b; Balanzat, 1998).

La nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt – Jakob (nvECJ) fue reportada por primera vez en 1996, cuando expertos del gobierno de Gran Bretaña anunciaban, basados en estudios de 10 casos con NvECJ, que el agente causal de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) "enfermedad de las vacas locas" se había extendido a los humanos (Aguzzi y cols., 1997). Hasta febrero de 1999 se habían presentado un total de 38 casos confirmados en Gran Bretaña y un caso con perfil clinicopatológico similar en Francia (Chazot y cols., 1996). La nvECJ se presenta en edades precoces, con una media de 29 años de edad, que evolucionan más rápido y comienzan con síntomas poco frecuentes, como: hiperpatía, cambios del carácter y ataxia. La demencia es un hecho constante, pero tardío (Balanzat, 1998).

El síndrome de *Gerstmann-Sträussler-Scheinker* (GSS) fue descrito por primera vez en 1936 por J.Gerstamnn, E. Sträussler y I. Scheinker (Richardson y Master, 1995),

tiene una incidencia de 2 casos por 100 millones. Aparece entre la 4ª y 6ª décadas de la vida y el promedio de vida es de 6 años, con una duración entre 1 y 16 años (Piccardo y cols., 1995; Balanzat, 1998; Furukawa y cols., 1998). Todos los casos son hereditarios, como consecuencia de una mutación puntual en el PRNP, con carácter autosómico. Las mutaciones en dicho gen (tabla 2) se presentan en los codones: 102, 105, 117, 145, 198 y 217 (Piccardo y cols., 1995; Balanzat, 1998).

La mutación más comúnmente observada es la del codón 102 (CCG → CTG), que resulta en una sustitución de leucina por prolina (P102L). Algunas formas se asocian a mutaciones del codón 145 e inserciones octapeptídicas (Furukawa y cols., 1998). La enfermedad de GSS puede exhibir un amplio rango de manifestaciones clínicas, incluyendo: ataxia, parálisis ligeras y espasmódicas (paraparesis espástica), parálisis agitante (parkinsonismo) y demencia (Furukawa y cols., 1998).

Gen	Mutación	Sustitución
102	CCG → CTG	P → L
105	CCA → CTA	P → L
117	GCG → GTG	A → V
198	TTC → TCC	F → S
217	CGG → CAG	Q → R

Tabla 2. Mutaciones en el gen PRNP, que provocan la enfermedad de GSS

1.2.- EPRs en animales

En los animales, los priones causan las Encefalopatías Espongiformes del ganado bovino (EEB) "enfermedad de las vacas locas", de ganado ovino, cabras, felinos silvestres y domésticos, e incluso de ungulados, como el venado y el ante (Prusiner, 1995; Belay, 1999; Gabus y cols., 2001). La forma más común de este tipo de enfermedades es el "scrapie", o prurito lumbar, que se presenta en las ovejas y cabras. El animal enfermo pierde la coordinación motriz, hasta el punto de no poder mantenerse en pie. Se torna irritable y en algunos casos sufre un prurito intenso que le lleva a arrancarse la lana (Prusiner, 1995).

en pie. Se torna irritable y en algunos casos sufre un prurito intenso que le lleva a arrancarse la lana (Prusiner, 1995).

La EPRs del ganado bovino, conocida a menudo con el nombre de la "enfermedad de las vacas locas", era conocida desde el siglo XVIII, pero en 1986 se presentó como epidemia en la Gran Bretaña (Prusiner, 1995). Se ha propuesto que la "enfermedad de las vacas locas" fue causada debido a la ingesta, por el ganado, de un suplemento alimenticio preparado a partir de restos de carne y huesos de ovejas, vacas, cerdos y pollos que presumiblemente contenía el agente infeccioso (Brown, 2001).

Con la llegada de grasas sintéticas, estos desechos animales dejaron de ser utilizados como fuente de grasas útiles y se dejó de aplicar el tratamiento para la extracción de grasas, donde los restos animales eran sometidos a solventes orgánicos y a vapores de altas temperaturas, tratamientos que presumiblemente desnaturalizaban la PrP^{sc}. En 1986 se dejó de utilizar el suplemento alimenticio, por la alta proporción de lípidos que contenía, aún sin sospechas de que fungiera como mecanismo de transmisión de la EEB. Actualmente, se piensa que esta fue la causa de la propagación de la proteína prion infecciosa (Brown, 2001). La epidemia desapareció debido a las modificaciones a la legislación Inglesa y luego Europea, promulgada en 1988, para controlar los alimentos suministrados al ganado que prohibió el uso de derivados de animales en los suplementos alimenticios del ganado (Prusiner, 1995; Brown, 2001). Las leyes para evitar la propagación de la enfermedad a los humanos, por la ingestión de carne proveniente de ganado enfermo, se establecieron por precaución, sin la certeza que la enfermedad por priones del ganado se pudiera transmitir al ser humano (Brown, 2001).

Las evidencias de la transmisión de las enfermedades por priones entre distintas especies se restringen a la inoculación directa, en el encéfalo, de los extractos de cerebro de ganado con EEB. Mediante este método la enfermedad ha sido transmitida a

ratones, ovejas, vacas, cerdos, minks, macacos (Brown, 2001) y al simio (Baker y Ridley, 1996). Sin embargo, la evidencia epidemiológica basada en la distribución geográfica de ambos padecimientos indica una posible relación entre el agente de las EEB y el de la nvECJ (Bruce y cols., 1997).

2.- Neuropatología de las EPRs

De manera general, las características neuropatológicas que distinguen a las EPRs son: formación de depósitos de PrP^{sc} en forma de placas, cambio espongiiforme, astrogliosis, pérdida neuronal y ausencia de reacción inflamatoria o respuesta inmunológica (Benheim y cols., 1985; Belay, 1999). La presencia y magnitud de estas características varía en cada tipo de EPRs y en cada caso (Bendheim y cols., 1985).

Las placas amiloides son el resultado de la acumulación de la PrP^{sc}, principalmente del fragmento de 27-30 KDa, aunque no es el único componente (Prusiner, 1995). Varían en densidad y forma en cada tipo de EPRs; son raras en la ECJ y abundantes en el Kuru y en el síndrome de GSS (Balanzat, 1998).

El cambio espongiiforme está caracterizado por la aparición de vacuolas finas de 20-200 µm de diámetro en el neurópilo, que pueden aparecer en cualquier capa de la corteza cerebral. Pueden llegar a confluir, resultando en la formación de vacuolas largas y múltiples que dañan substancialmente la citoarquitectura cortical (Masters y Richardson, 1978).

La astrogliosis es el factor más constante, aunque inespecífico (se comparte en todas las demencias causadas por procesos neurodegenerativos). En las regiones afectadas se observan numerosos astrocitos reactivos, formando un denso plexo de prolongaciones llenas de filamentos gliales. En algunos casos este signo, junto con la pérdida neuronal, pueden ser los únicos datos patológicos observables (Balanzat,

1998). También se ha identificado la presencia de células microgliales en estrecha cercanía con las placas de fibras de la PrP^{sc} (Barcikowska y cols., 1993).

Muerte neuronal. Aún se desconoce la relación que existe entre la presencia de PrP^{sc} y la muerte neuronal. Si bien se ha observado, en cultivos celulares, que la conversión de PrP^c en PrP^{sc} se produce en el interior de las neuronas; acumulándose en los lisosomas, no se ha demostrado si esta acumulación es la causa de la muerte neuronal (Prusiner, 1995). Una propuesta es que la toxicidad de la PrP^{sc} se basa en las modificaciones que ésta ejerce sobre las propiedades de la membrana plasmática de las neuronas y células gliales. Apoyando esta teoría se ha encontrado que particularmente el fragmento de la PrP^{sc}, que comprende los aminoácidos 106 a 126, tiene la posibilidad de insertarse en la membrana plasmática, observándose *in vitro* el incremento de su viscosidad (Salmona y cols., 1997), lo que puede estar relacionado con disfunciones en la actividad de receptores o canales iónicos (Diomedea y cols., 1996). También se ha propuesto que la muerte de las neuronas se debe a la pérdida de la función de la PrP^c (Prusiner, 1985).

3.- Neuropatología del síndrome de GSS.

En la enfermedad de GSS se presentan placas multicéntricas que difieren de las placas pequeñas y unicéntricas del "Kuru" (Ghetti y cols., 1995), lo que implica en general estructuras más difusas. Los depósitos de la PrP^{sc} presentan especial afinidad tintorial central al rojo Congo, rojo Sirius y a otros colorantes para amiloides (Gulroy y cols., 1999). En el síndrome de GSS los depósitos se presentan en gran número en el cerebelo, principalmente en las capas molecular y granular, y ocasionalmente en la sustancia blanca. Sin embargo, también se observan depósitos en los hemisferios cerebrales, involucrando a la corteza cerebral, a los ganglios basales, al tálamo y al hipotálamo (Brown y cols., 1994). El cambio espongiiforme ocurre en diversos grados,

en la capa molecular del cerebelo no se presenta, pero en algunos casos de GSS se ha descrito en la corteza cerebral, ganglio basal y tálamo. En GSS existe una interesante relación entre la presencia del cambio esponjiforme y su transmisibilidad. En aquellos casos donde se observa poco o nulo cambio esponjiforme existe la dificultad o imposibilidad de transmitir la enfermedad a animales (Brown y cols., 1994).

4.- Transmisión de las EPRs

El argumento de mayor peso contra la posibilidad de que la EBB se pudiera transmitir a los humanos se sustenta en la dificultad de transmitir las EPRs entre distintas especies, fenómeno conocido como "barrera inter-especie", descrito por Pattinson en los 70's, cuando observó la dificultad de transmitir el scrapie de las ovejas a ratones de laboratorio (Prusiner, 1995). Prusiner y R. Scott crearon ratones transgénicos que expresaban el gen PrP^c (PRNP) del hámster sirio, es decir, que estos ratones producían la proteína PrP^c de hámster. El gen murino difiere del gen del hámster en 16 codones de los 253 que conforman a la proteína. Posteriormente, en un experimento se inoculó un extracto de cerebro de hámster con PrP^{Sc}, tanto a ratones normales como a los transgénicos, observándose que la enfermedad no se transmitió a los ratones normales, mientras que los ratones transgénicos enfermaron antes de dos meses. Con la inserción de genes de hámster en el ratón se logró franquear la barrera inter-especie, de este modo se advirtió que esta barrera reside en la secuencia de aminoácidos de la proteína prion (Prusiner, 1993). Con base en estos resultados y en la teoría "sólo proteína", se ha postulado que cuanto más se asemeje la secuencia de una molécula de PrP^{Sc} patológica a la secuencia de la PrP^c del huésped, mejor será la interacción entre las moléculas y mayor será la probabilidad de que el huésped adquiera la enfermedad priónica (Prusiner, 1995).

Para explicar la transmisibilidad del scrapie, surgieron distintas teorías, por años la mayoría de los investigadores atribuyeron la naturaleza del agente causal de este tipo de enfermedades a un virus. Sin embargo, el virus o partículas víricas nunca pudieron ser aisladas. A mediados de los 60's Griffith y T. Alper propusieron que el agente causal de las EETs carecía de ácidos nucleicos y que podría tratarse de una proteína (Alper y cols., 1966; Cughey, 1994), hipótesis que fue ratificada por la propiedad de resistencia que exhibe la PrP^{sc} a la radiación ultravioleta u ionizantes, tratamientos que desnaturalizan ácidos nucleicos. Cuando los extractos de cerebro infectado con scrapie fueron tratados con este tipo de radiaciones, los extractos retuvieron su capacidad infectante. De esto se dedujo que la entidad infecciosa carecía de ADN y ARN, resultando evidente que no se trataba de un virus o de cualquier otro tipo de agente infeccioso conocido (Prusiner, 1995).

En 1972, a través de inyecciones intracerebrales de extractos de cerebros enfermos a animales sanos, Stanley B Prusiner relacionó ECJ, el Kuru y el scrapie. En 1982 Prusiner y sus colaboradores aplicaron técnicas desnaturalizantes de proteínas a extractos de cerebro de hámster, observando que mermaba su capacidad infecciosa, logrando determinar que la naturaleza del agente infeccioso de este tipo de enfermedades era una proteína (Prusiner, 1992; Prusiner 1983; Prusiner, 1995). Por lo tanto, el agente infeccioso del prurito lumbar (y quizá de enfermedades afines) carecía de ácido nucleico y estaba constituido principalmente, sino exclusivamente, por proteínas. Así, Prusiner acuñó para este tipo de vector el término de "prion" (PrP), para distinguirlo de otros agentes patógenos conocidos (Prusiner, 1992; 1995).

En 1984 Bruno Oesch, demostró que las células de hámster portaban un gen que codificaba para la PrP^c, casi al mismo tiempo, Bruce Chesebore estableció que las células del ratón también albergaban este gen. Aislado el PRNP, se observó que la mayoría de las veces los animales que producen la PrP^c no desarrollan la enfermedad

(Oesch y cols., 1985). Entonces, Prusiner supuso la existencia de una variante normal de la proteína prion patógena, y Roland A. Barry identificó esta proteína sensible a proteasas (Meyer y cols., 1996); esto sugirió que la PrP causante del prurito lumbar era una variante de la proteína normal. La proteína normal fue denominada "PrP celular" (PrP^c) y la forma infecciosa, resistente a las proteasas, "PrP del prurito lumbar"= "PrP scrapie" (PrP^{sc}). Esta última expresión designa ahora a las moléculas de proteína que constituyen los priones de todas las enfermedades, semejantes al prurito lumbar, que se presentan en los animales y en el hombre (Prusiner, 1992).

En 1988, el equipo de Prusiner con la ayuda de T.J. Crow y J. Olt establecieron la vinculación genética entre las mutaciones de la PrP y la enfermedad de GSS (Hsiao y cols., 1989), y en colaboración con K. Hsiao, D. Groth y S.J. De-armond, Prusiner demostró que el scrapie se puede transmitir, de animales con el gen mutado (por inoculación intracerebral) a animales sanos (Scott y cols., 1993; Telling y cols., 1994). Con esto, Prusiner afirmó que la proteína codificada por el gen mutado era la única responsable de la transmisión de las EPRs (Prusiner, 1995).

5. - Naturaleza molecular de la PrP^c

La PrP^c es una glicoproteína de superficie celular (Balanzat, 1998; Brown, 2001). Se encuentra altamente conservada a lo largo de la escala filogenética. Se presenta en los mamíferos, aves e incluso en reptiles, como es el caso de la tortuga (Weissmann, 1999; Brown, 2001). Además, se expresa en varios tejidos, como el nervioso, muscular y en el sistema inmunitario (Horiuchi y cols., 1995). La expresión de altos niveles de la PrP^c en las neuronas, específicamente en las sinapsis (pre- y post-sinapsis), sugiere la importancia de la PrP^c en el funcionamiento de éstas (Cashman y cols., 1990; Horiuchi y cols., 1995; Brown, 2001). Sin embargo, su función aún no ha sido esclarecida (Gabus y cols., 2001).

Los análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) muestran que la proteína prion humana cuenta con un dominio globular, que se extiende desde el residuo 121 hasta el 228; este dominio contiene tres estructuras α -hélice, en los residuos 144-154, 173-194 y 200-228. Además, existen dos dominios en láminas β -plegada que comprenden los residuos 128-131 y 161-164 (Figura 1) (Zahn y cols., 2000). Dentro del dominio globular existen tres zonas que presentan alto grado de irregularidad estructural: la primera es una asa, en los residuos 167-171; la segunda, el final de la segunda hélice entre los residuos 187-194 y la tercera zona en la tercera hélice entre los residuos 219-228 (Figura 1) (Zhang y cols., 1997). Se ha demostrado *in vitro* que estos dominios son capaces de cambiar espontáneamente de conformación hacia estructuras de lámina- β (Balanzat 1998). Uniendo dos estructuras α -hélice se presenta el único puente disulfuro de esta proteína (Brown, 2001).

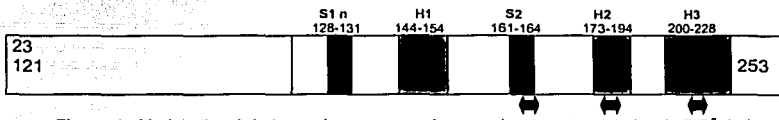


Figura 1.- Modelo lineal de las regiones que conforman el segmento globular de PrP^{Sc} de humano (23-252), indicando la posición teórica de las estructuras α -hélice (H1, H2, y H3), láminas β -plegada (S1 y S2) y las regiones de irregularidad estructural (flechas bidireccionales) (Liemann y Glockshuber, 1999).

La PrP^{Sc} presenta una región, cercana al extremo amino terminal (N-terminal), de repeticiones octapeptídicas rica en prolinas y glicinas; además, presenta una región hidrofóbica que es fácilmente escindida durante el catabolismo de la PrP^{Sc}, el cual se lleva a cabo en el sistema endosómico-lisosómico y genera diversos fragmentos de la proteína (Figura 2). Uno de ellos es un fragmento de 27-30 KDa (Balanzat, 1998; Brown 2001), que resulta ser del mismo peso molecular que el fragmento resistente a proteasas y es el componente mayoritario de los depósitos en placas de la PrP^{Sc} (Bolton y cols., 1982; Prusiner, 1984).

Después de que la PrP^c es sintetizada en el RE, postraduccionalmente en este mismo compartimiento, se elimina un segmento de 23 aminoácidos en su carboxilo terminal (C-terminal) (Stahl y cols., 1987; Stahl y Prusiner, 1991) y le es adicionada una cadena de glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) que funcionará como ancla en la membrana plasmática. Con esto expondrá el resto del polipéptido a la cara extracelular de la membrana. El ancla de GPI está compuesta de 1 ó 2 cadenas oligosacáridas, que están estrechamente unidas al C-terminal (*Figura 2*) (Brown, 2001; Walmsley y cols., 2001). La PrP^c posee dos sitios accesibles para glicosilación en dos residuos de asparagina, por lo que esta proteína puede tener una, dos o ninguna cadena de carbohidratos, *figura 2* (Brown, 2001).

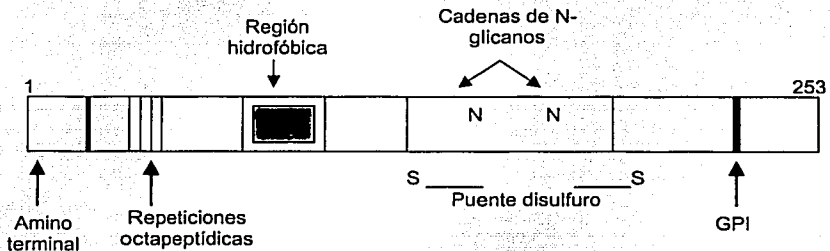


Figura 2. Representación lineal de las regiones reconocidas en la PrP^c (Brown, 2001)

6. – Posible función de la PrP^c como receptor de Cu²⁺.

Se ha observado que el Cu²⁺ estimula la endocitosis de la PrP^c desde la superficie celular, de manera rápida e irreversible (Quaglio y cols., 2001), lo que abre la posibilidad de que la PrP^c funcione normalmente como receptor celular de Cu²⁺. Otra conexión entre la PrP^c y el cobre se basa en los niveles más altos de Cu²⁺ en las sinapsis de células carentes de expresión de PrP^c, por lo que estas células son más susceptibles al estrés oxidativo (Brown, 2001). Además, otra evidencia reportada por varios laboratorios, es la afinidad que presenta el Cu²⁺ por las repeticiones

octapeptídicas en el N-terminal de la PrP^c de mamíferos. La unión del Cu²⁺ a esta zona depende del pH, e induce un cambio conformacional en esta región de la molécula (Diomedea y cols., 1996; Quaglio y cols., 2001).

7.- Propiedades de las isoformas PrP^c y PrP^{sc}

Tanto la PrP^c como la PrP^{sc}, son codificadas por el mismo PRNP del hospedero, y aunque no han sido detectadas diferencias químicas entre ambas isoformas, ni en las uniones covalentes, ambas isoformas difieren notablemente en sus propiedades bioquímicas y fisiológicas (Prusiner, 1995; Weissmann, 1999; Zahn y cols., 2000).

- La PrP^c se encuentra en la membrana plasmática de las células (Bell e Ironside, 1993). Está compuesta en 42% de estructuras α -hélice, y tan sólo un 3% de láminas β -plegada. Es monomérica, sensible a la digestión con proteasas y soluble en presencia de detergentes (Stahl y cols., 1990; Liemann y Glockshuber, 1999) (Figura 2).

- La PrP^{sc} se encuentra en el citoplasma de células infectadas, en depósitos en forma de placas, en el endotelio y en los vasos sanguíneos (Bell e Ironside, 1993). Posee un 43% de láminas β -plegada y 30% de α -hélice (Figura 4) (Pan y cols., 1993; Liemann y Glockshuber, 1999; Zahn y cols., 2000). Es un amiloide oligomérico insoluble, parcialmente resistente a proteasas, insoluble a detergentes. Además, presenta resistencia a agentes desnaturizantes de ácidos nucleicos y a desinfectantes comunes como el alcohol e hipoclorito de sodio (Bell e Ironside, 1993). Es desnaturizado de manera irreversible por álcalis (Prusiner, 1982), por digestión con tripsina y proteínasa K y por exposición a fenol (Diener y cols., 1982).

8.- Teorías del cambio Conformacional de la PrP^c

Se ha establecido que el evento fundamental en las EETs es el cambio conformacional de PrP^c a PrP^{sc} (Caughey y Raymon, 1991; DebBurman y cols., 1997), por lo que, las investigaciones sobre las EETs se han centrado en la elucidación de este fenómeno. Se presume que en las tres manifestaciones etiológicas, el padecimiento inicia con el cambio conformacional, seguido de un proceso de propagación autocatalítico (Gasset, 1996; Weissmann, 1999). A continuación se mencionan las distintas hipótesis para explicar el cambio conformacional de la PrP.

Desestabilización de la PrP^c por mutaciones en el PRNP.

Muchas de las mutaciones en la PrP^c observadas en el ser humano, provocan la sustitución de un aminoácido dentro de las cuatro α -hélices o en sus zonas vecinas (Prusiner, 1995; Balanzat, 1998). La inserción de aminoácidos incorrectos en esas posiciones desestabiliza la estructura de las α -hélices, aumentando la probabilidad de que la hélice afectada y sus vecinas se plieguen de nuevo para adquirir la conformación de lámina β -plegada (Prusiner, 1995), sin necesidad de tener contactos con PrP^{sc} exógena (Narwa y Harris, 1999). Sin embargo, los datos experimentales y la posibilidad de que este tipo de padecimientos sea transmitido por tan variados mecanismos sugieren que la desestabilización provocada por las mutaciones no es el único mecanismo que puede conducir a la formación de PrP^{sc} (Zahn y cols., 2000). (Liemann y Glockshuber, 1999).

Interacciones moleculares entre la PrP^c y la PrP^{sc}.

Estudios en animales han sugerido que el cambio conformacional de la PrP es el resultado de interacciones directas entre las moléculas de la PrP^c y de la PrP^{sc} (Prusiner y cols., 1981). Aunque la naturaleza de esta interacción es poco entendida, se

ha postulado que la PrP^{sc} sirve como molde, dirigiendo la formación de nueva molécula de PrP^{sc} a partir de la PrP^c del hospedero, por lo que se requiere la presencia de la PrP^c en el hospedero para que pueda ser establecida una infección. Esto lo demostró Prusiner en 1982, mediante la resistencia a la infección por scrapie de ratones knock out para el PRNP (Telling y cols., 1996; Weissman, 1999; Cohen, 1994). Esta hipótesis explicaría el mecanismo de transmisión infeccioso, e incluso el esporádico, dado que el cambio conformacional aleatorio de una molécula de PrP^c, o la inoculación de una pequeña cantidad de PrP^{sc} (ver pag. siguiente) bastaría para iniciar el cambio conformacional de otras PrP^c.

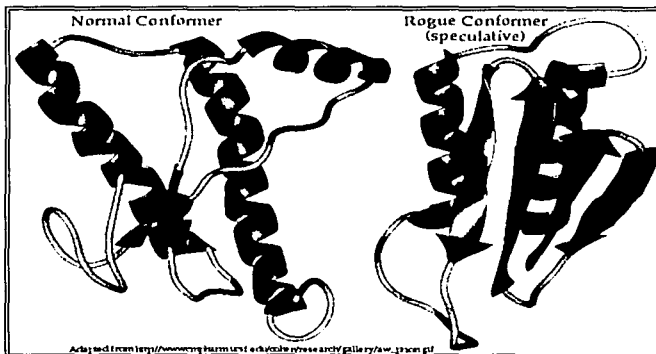


Figura 3. Modelos de las diferencias conformacionales entre la PrP^c y la PrP^{sc}.

Existen dos modelos para explicar el cambio conformacional de la PrP^c con base en la teoría de las interacciones moleculares entre PrP^c y PrP^{sc}:

a) El "modelo de plegamiento" propone que la conversión requiere que la PrP^c se encuentre desenrollada (desplegada) y que se vuelva a plegar por segunda ocasión de manera anormal, bajo la influencia de una molécula de PrP^{sc}. Este proceso requiere franquear una barrera energética muy grande (Gasset, 1996; Weissman, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) El "modelo de nucleación" propone que la PrP^c se encuentra en equilibrio conformacional con respecto a la PrP^{sc} (o precursor de ella). Aunque la conformación PrP^c es favorecida fuertemente, la PrP^{sc} solo se estabiliza cuando encuentra otras moléculas de PrP^{sc}, formando los agregados (lo que se asemeja al fenómeno de nucleación de los cristales, que inicia con un cristal "semilla"). Los agregados de la PrP^{sc} requieren para su formación un gran número de moléculas PrP^{sc}, que se pueden formar espontáneamente, lo que hace a este evento algo poco probable de ocurrir. Sin embargo, ya presente la molécula(s) de nucleación, la transformación de otras PrP^c puede ocurrir rápidamente (Cohen y cols., 1994; Gasset, 1996).

Procesos postraduccionales

Los procesos postraduccionales son modificaciones que sufren las proteínas para adquirir su conformación biológicamente activa. Las alteraciones en estos procesos podrían modificar la conformación de la PrP^c. Estudios realizados en este ámbito han determinado que la PrP^c puede presentar alteraciones en los procesos postraduccionales de acortamiento, que se observa en la angiopatía amiloide por PrP^{sc}. Además, diferencias sutiles en el contenido de N-glicanos entre la PrP^{sc} y la PrP^c se han descrito recientemente, argumentando que en la PrP^{sc} el mecanismo postraduccionales de glicosilación se encuentra perturbado (Rudd y cols., 1999).

Estudios de la expresión de la PrP^c han sugerido que otros factores celulares pueden influenciar la patogénesis de las EPRs, o funcionar como reguladores de la enfermedad. Ninguno se ha establecido de manera concluyente (Basler y cols., 1986; Taraboulos y cols., 1990; Kaneko y cols., 1997; DebBurman y cols., 1997). Sin embargo, la sospecha de que la identidad de este factor sea proteica ha dado como resultado la denominación, a este factor molecular hipotético, como la proteína "X", mientras se identifica su naturaleza (Weissman, 1999; Korth y cols., 2000). Dentro de

los grupos moleculares, el de las chaperonas moleculares es el que con mayor frecuencia ha sido relacionado con el establecimiento de la alteración conformacional de la PrP, debido a las importantes funciones que desempeñan este tipo de proteínas en la conformación, estabilidad y resistencia a degradación de las proteínas a las que se encuentran asociadas (DebBurman y cols., 1997).

En la década de los 80's, Ellis y cols. establecieron la definición del término "chaperona molecular", como una proteína que media el plegamiento de otros polipéptidos y, en algunos casos el ensamble en estructuras oligoméricas, aunque la chaperona no es un componente final de dichas estructuras (Ellis y Hemmingsen, 1989). El término chaperona molecular fue utilizado por primera vez por Laskey y cols., para describir la función de la nucleoplasmina; una proteína ácida nuclear requerida para el ensamblaje de los nucleosomas, a partir de ADN e histonas en extractos de huevos de *Xenopus laevis*. La nucleoplasmina promueve las interacciones entre las histonas, disminuyendo la repulsión electrostática entre ellas y minimizando la formación de agregados inespecíficos e insolubles (Ellis y Hemmingsen, 1989). Se ha comprobado *in vitro* que chaperonas moleculares como (GroEL) y Heat Shock Protein 104 (Hsp104) promueven la conversión de la PrP^c a PrP^{sc}, y en contraste, moléculas como sacarosa, trehalosa y dimetil sulfóxido (DMSO) la inhiben (DebBurman y cols., 1997).

9.- Glucosilación

La glucosilación consiste en la adición covalente de azúcares a las proteínas y lípidos de manera enzimática, donde los carbohidratos permanecen como cadenas laterales. En particular, las proteínas glucosiladas o glicoproteínas tienen funciones importantes en membranas, lisosomas y en el espacio extracelular. En contraste, pocas proteínas del citosol se encuentran glucosiladas (Alberts y cols., 1989).

Las glicoproteínas contienen una o más cadenas de carbohidratos. Estas cadenas están clasificadas de acuerdo con el aminoácido de la proteína al que se une el azúcar. Si la transferencia del oligosacárido se hace al grupo amino terminal de un residuo de asparagina (N), a esta proteína se le denomina N-glicosilada. Si la unión se realiza sobre el hidroxilo de los residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) se llama entonces O-glicosilada (Beyer y cols., 1981; Alberts y cols., 1993).

Mientras que la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas se lleva a cabo mediante copias de un molde, y a través de una serie repetida de pasos idénticos y utilizando la(s) misma(s) enzima(s), en la glicosilación se requiere de una enzima diferente en cada paso, de forma que cada producto de reacción es reconocido como sustrato exclusivo por la siguiente enzima de la serie (Alberts y cols., 1993). Las enzimas implicadas en los procesos de glicosilación están controladas por su nivel de expresión genética. Alteraciones en la regulación de estas enzimas pueden cambiar la naturaleza de los carbohidratos presentes en la superficie celular. Por ejemplo, células tumorales comienzan a expresar en muchas ocasiones altos niveles de ácido siálico en su superficie (Prieels y cols., 1981; Osborn y Khan, 2000).

Existen secuencias particulares que sirven como señales para la unión de oligosacáridos a la asparagina: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina). La N-glicosilación es realizada en el RE, durante o después de la síntesis de la cadena proteica de manera cotraduccional o postraduccional (Walmsley y cols., 2001). En el RE se unen oligosacáridos simples (formados de 14 residuos como máximo), tales como N-acetil glucosamina (GlcNAc), manosa (Man) y glucosa (Glc). La transferencia de estos oligosacáridos es catalizada por las glicosiltransferasas que se encuentran unidas a la membrana del RE y que poseen el sitio activo dirigido al lumen del mismo (Clausen y Benneth, 1996). La N-glicosilación

juega un papel esencial en el plegamiento, estabilidad, transporte intracelular, secreción y función, de las proteínas (Walmsley y cols., 2001).

La reacción inicial de la O-glicosilación es la adición de N-Acetilgalactosamina a un grupo hidroxilo de Ser o Thr de la cadena polipeptídica. El proceso de O-glicosilación se inicia en el aparato de Golgi (Wang y cols., 1992). Los azúcares comúnmente encontrados en las cadenas O-glicosiladas son: N-acetilgalactosamina (GalNAc), galactosa (Gal), ácido siálico (SA) y fucosa (Fuc) aunque manosa y glucosa también han sido reportadas (Dutta y Rao., 1982). Análisis por Northern blot sugieren la existencia de toda una familia de enzimas N-acetil-galactosaminotransferasas que están presentes de acuerdo al tipo celular (Clausen y Bennett, 1996; Marth, 1996). Los oligosacáridos con unión tipo-O son los últimos en añadirse a las cadenas polipeptídicas, por lo que juegan un papel determinante en las interacciones ligando-receptor, infectividad vírica, fertilización, regulación del sistema inmunitario y durante la diferenciación celular. También pueden inhibir la degradación proteolítica, así como contribuir a la conformación y estabilidad de una proteína (Schachter, 1986).

10 – Glicosilación de la PrP^c

La PrP^c posee dos sitios propicios para cadenas de N-oligosacáridos, uno en el asa que une dos alfa-hélices (Asp 181 Ile Thr) (Endo y cols., 1989) y otro en el C-terminal (Asp 197 Phe Thr) (Rudd y cols., 2001). Los sitios son ocupados en forma variable, y son cuatro las glicofomas de la proteína que coexisten. Una está doblemente glicosilada, dos monoglicosiladas y una no glicosilada (Korth y cols., 2000). Los N-oligosacáridos de la PrP^c establecen formas de ortógonos con carga negativa fuerte (Figura 4). Estas estructuras cubren a la proteína, impidiendo, por efecto estérico, las interacciones intramoleculares o intermoleculares que involucren a los primeros 90 amino ácidos (Rudd y cols., 2001).

glicosilación, la tunicamicina, produjeron especies simples de la PrP^c, no glicosiladas, pero resistentes a proteasas. Con este experimento se concluyó que la glicosilación

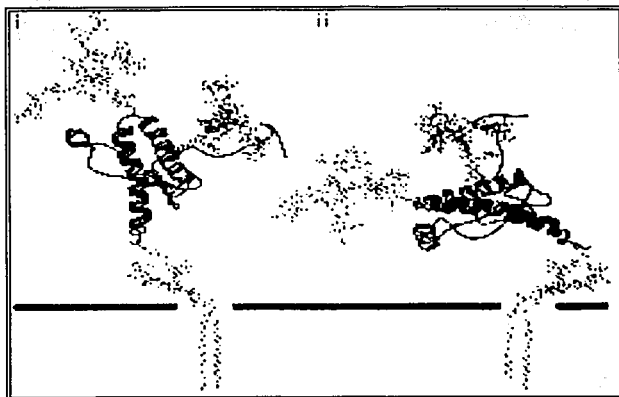


Figura 4. Modelos de la PrP^c anclada a la membrana plasmática mediante el GPI, con sus dos sitios para N-glicanos ocupados, por las cadenas que establecen formas ortogonales, y los posibles sitios para O-glicosilación (esféricas) (Rudd y cols., 2001).

sobre asparagina no es esencial para la síntesis de la PrP^c resistente a proteasas (Taraboulos y cols., 1990; Walmsley y cols., 2001). Si las moléculas de PrP^{sc} no glicosiladas se asocian con la infectividad en la enfermedades por priones aún no ha sido establecido (Taraboulos y cols., 1990).

Aunque en los modelos de la PrP^c aparece un número importante de sitios accesibles para la O-glicosilación, no se han detectado O-glicanos en la PrP^c aislada a partir de hámsters, ni en aislados de PrP 27-30 de cerebros de hámsters infectados con scrapie (Rudd y cols., 2001).

Análisis del ancla de GPI de la PrP^{sc} han revelado la existencia de 6 glicofomas, de las cuales dos contienen N-acetil ácidoneuroamínico (ácido siálico), carbohidrato no reportado previamente para ningún otra ancla proteica de GPI. Sin embargo, no se han

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis del ancla de GPI de la PrP^{sc} han revelado la existencia de 6 glicoformas, de las cuales dos contienen N-acetil ácidoneuroamínico (ácido siálico), carbohidrato no reportado previamente para ningún otra ancla proteica de GPI. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en el contenido de ácido siálico en el GPI que distinguan la PrP^c de la PrP^{sc} (Stahl y cols., 1992).

11. - Lectinas

Inicialmente, los carbohidratos sólo tenían importancia para la industria alimenticia, como fuente nutricional de alto contenido energético. Sin embargo, el aislamiento de una proteína vegetal de extractos de *Canavalia ensiformis*, en 1919 por James B. Sumner, la cual se unía a eritrocitos y causando que estas células se precipitaran, dió inicio al estudio de las proteínas con capacidad de unirse a carbohidratos. En 1954, W. Boyd denominó a estas proteínas lectinas, del latín "*lagere*" = escoger (Osborn y Khan, 2000).

Actualmente, las lectinas son aisladas a partir de plantas, animales o microorganismos. Como herramientas histoquímicas y citoquímicas son estables, específicas y muy sensibles. La histoquímica con lectinas puede revelar sutiles alteraciones en la glicosilación de otro modo indistinguibles. Las alteraciones en la glicosilación son fenómenos comunes durante la embriogénesis, el crecimiento y los eventos patológicos (Rhodes y cols., 1998).

Las lectinas de plantas y animales contienen muy poca homología. Interactúan con los oligosacáridos por medio de puentes de hidrógeno, coordinación con metales, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. La presencia de un gran número de grupos hidroxilo en los azúcares favorece las uniones, mediante puentes de hidrógeno, con los aminoácidos de las proteínas, particularmente con la Asp y Asn (Osborn y Khan, 2000). La unión de lectinas con los monosacáridos es débil, pero ésta

es incrementada a través de múltiples uniones. Una hipótesis, al respecto de la extraordinaria selectividad de las lectinas, propone que las múltiples uniones no sólo se realizan con el carbohidrato al que es más afín la lectina, sino con los carbohidratos adyacentes, por lo que la especificidad depende de la posición que ocupa el carbohidrato en la cadena (Osborn y Khan, 2000).

II.- ANTECEDENTES

Dentro de las distintas enfermedades neurodegenerativas, existen demencias que se caracterizan histopatológicamente por presentar depósitos con propiedades tintoriales de amiloide, es decir que se tiñen con las mismas sustancias que el almidón (Jin y cols., 2000). Aunque los depósitos no contienen este polisacárido, esta propiedad revela la presencia de carbohidratos (Propeth y cols., 1992). La enfermedad neurodegenerativa más común, Alzheimer (EA) presenta como características histopatológicas depósitos amiloides en forma de placas denominadas placas neuríticas (PNs); formadas principalmente por depósitos de la proteína amiloide- β , marañas neurofibrilares (MNFs) y neuritas distróficas (Guevara y cols., 1998; Balanzat, 1998). La EA se presenta tanto en forma familiar como esporádica, se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria que concluye en una demencia profunda. Es un padecimiento de carácter multifactorial con varios factores de riesgo, entre los que destacan el envejecimiento, los traumatismos craneoencefálicos y la predisposición genética. En la variante familiar de la EA están ligados tres genes: el precursor del amiloide- β (APP) y las presenilinas 1 y 2 (Balanzat, 1998).

Asociados a los depósitos de la proteína amiloide- β se han encontrado O-glicanos (Guevara y cols., 1998). Los depósitos de la PrP^{Sc} de las distintas EPRs, incluyendo los del síndrome de GSS también presentan propiedades tintoriales de amiloide, además presentan afinidad específica por el colorante azul de toluidina (Sánchez y cols., 2000)

colorante que tiñe mucinas; tipo de sustancias formadas principalmente por O-glicanos (Gaffney,1992).

III: - JUSTIFICACIÓN

La demencia se define como un síndrome producido por causa orgánica capaz de provocar deterioro persistente de las funciones mentales superiores que con lleva a una incapacidad funcional tanto en el ámbito social como laboral. Dentro del contexto de las enfermedades ligadas a la edad, las demencias son las enfermedades que despiertan mayor preocupación clinicosanitaria, ya que aparte de ser para el grupo de edad, la primera causa de incapacitación y muerte, provocan gastos desproporcionados y difíciles de cubrir por los sistemas de salud. (López-Pousa, 2002).

Distintas enfermedades neurodegenerativas que implican demencia comparten con las EPRs la presencia en el SNC de depósitos amiloides constituidos en parte de una proteína alterada conformacionalmente. Tal es el caso de la enfermedad de Alzheimer. El determinar las similitudes y diferencias químicas entre los depósitos de las proteínas amiloide- β y PrP^{sc} nos ayudará a comprender los mecanismos que generan los depósitos amiloides y su relación con estas patologías. Estudios de gran importancia debido al cambio de estructura social de nuestro país, y del mundo, donde se presenta un notable aumento en la proporción de personas mayores de 60 años (INEGI, 2000).

V. – OBJETIVOS

Objetivo general:

➤ Determinar la presencia de alteraciones en el proceso de O-glicosilación en los depósitos amiloides de la PrP^{Sc} en el síndrome de GSS.

Objetivos particulares:

➤ Determinar la presencia, la naturaleza y distribución de residuos O-glicosilados en tejido cerebelar de un caso con el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.

➤ Determinar la relación espacial de los residuos O-glicosilados con los distintos depósitos de la proteína PrP^{Sc}.

V. – HIPÓTESIS

Durante eventos patológicos y de desarrollo del encéfalo con frecuencia se han encontrado alteraciones en la expresión de O-glicanos, aunado a esto los depósitos de la proteína amiloide- β de la EA, que presentan características morfológicas y tintoriales similares a los de la PrP^{Sc}, presentan asociación anormal con O-glicanos, por lo que probablemente en los depósitos de la PrP^{Sc} también se encuentren anomalías en la expresión de O-glicanos.

VI. - MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

En este trabajo fue utilizada una muestra de encéfalo de un caso con demencia, de un sujeto masculino de 53 años de edad y con diagnóstico molecular del síndrome de GSS (mutación PNRP P102L). Se utilizaron, como control negativo, tres muestras de encéfalos normales de 65 \pm 9 años y dos muestras de casos con la enfermedad de

Alzheimer de 76±3 años, que para el caso de la lectina MAA son positivas (Guevara y cols, 1998).

De acuerdo con el protocolo del laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Ielasco Suárez (INNN), la mitad de los encéfalos fueron fijados en solución acuosa de formaldehído al 10% (Anexo I). Las muestras seleccionadas fueron deshidratadas (Anexo III) e incluidas en bloques de parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μ de espesor que fueron montados en portaobjetos con silano, como adhesivo del tejido (Anexo II).

Precauciones: Debido a que se desconoce la magnitud del riesgo que se corre al manejar tejido con priones, este trabajo fue realizado bajo las siguientes condiciones de seguridad: dobles guantes de látex, doble cubre-bocas, lentes de protección. Todo el equipo utilizado (microtomo, cuchillas) o que tuvo algún contacto con el tejido fue descontaminado con cloro al 30%. Posteriormente, el material de cristal fue sumergido en solución comercial desnaturizante de proteínas - alcazyme (alkapharm) por 15 min y en la solución esterilizante alkacide (alkapharm) por 5 min. Guantes y cubre-bocas fueron desechados en contenedores destinados para su posterior incineración.

Los cortes de los distintos casos fueron desparafinados y rehidratados, sumergidos en ácido fórmico y lavados. Posteriormente, les fueron aplicadas las técnicas de hematoxilina-eosina (H y E), impregnación argéntica (método de Bielschowsky), azul de toluidina, inmunohistoquímica anti-PrP^{Sc}, histoquímica con lectinas y doble marcaje lectinas-anti-PrP^{Sc} para microcopla confocal (Figura 5).

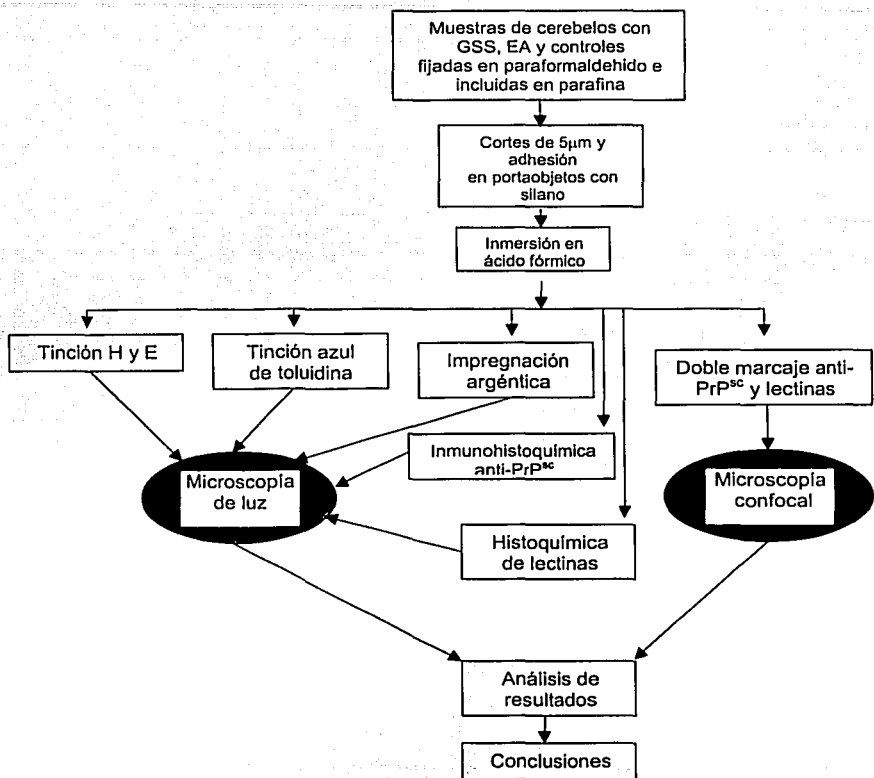


Figura 5. Diagrama de flujo de las técnicas aplicadas en este trabajo.

1.- Tinción con Hematoxilina y Eosina (H & E)

La tinción con H y E es una técnica de rutina, que se utiliza para detectar alteraciones celulares a nivel morfológico. La hematoxilina es un colorante natural que tiñe el núcleo celular de color azul-morado y en combinación con la eosina, que tiñe el citoplasma de rosa, permite observar la relación de dimensión entre el núcleo y el

citoplasma celular (Prophet y cols., 1992). Las secciones del tejido fueron sumergidas en hematoxilina de Gill durante 3 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua corriente y se sumergieron en eosina durante 1 min, por último fueron deshidratadas con alcoholes, aclaradas con xilol y montadas con resina sintética (Anexo III).

La solución de hematoxilina de Gill se preparó agregando a 730 ml de agua destilada, en la siguiente secuencia: 250 ml de etilenglicol, 2 gr de hematoxilina anhidra en polvo (Sigma), 0.2 gr de yodato de sodio, 17.6 gr de sulfato de aluminio $Al_2(SO_4)_3$ y 2 ml de ácido acético glacial. Una vez agregados todos los reactivos la solución fue mantenida en agitación por 1 hr a temperatura ambiente, y antes de ser utilizada fue filtrada. La solución base de eosina fue preparada con 1 gr de eosina amarillenta (Sigma), 20 ml de agua destilada y 80 ml de alcohol etílico al 96%. Para la solución de uso fue mezclada una parte de la solución base, con tres partes de alcohol etílico al 96% y 1 ml de ácido acético glacial.

II.- Tinción con azul de toluidina

Las secciones del tejido fueron sumergidas en una solución de alcohol etílico absoluto y ácido acético glacial en proporción 3:1, por 10 min posteriormente, en una solución de azul de toluidina por 10 min. Por último, las secciones fueron enjuagadas con agua corriente, deshidratadas con alcoholes, aclaradas con xilol y montadas con resina sintética (Anexo III).

La solución de azul de toluidina es preparada al 1% de azul de toluidina (Sigma) en agua destilada. Se le adicionó borato de sodio 100 mg/100 ml y fue filtrada, la solución en estas condiciones estuvo lista para ser utilizada (debe prepararse el mismo día en que se utiliza).

III.-Impregnación argéntica (Método de Bielschowsky).

Las secciones del tejido fueron sumergidas en una solución de nitrato de plata al 20% en oscuridad y a 38°C por 15 min (no tirar la solución de plata). Lo adecuado es que el tejido tome un color beige. Posteriormente, fueron enjuagadas con agua destilada y sumergidas en la solución de plata amoniacal a 38°C durante otros 15 min, también en oscuridad. Esta solución se preparó añadiendo a la solución de nitrato de plata (que fue utilizada previamente) nitrato de amonio al 1% gota a gota, hasta la obtención de una solución incolora. Después, las láminas fueron enjuagadas en una solución de amonio al 1%. Nuevamente, fueron sumergidas en la solución de plata amoniacal. Una vez inmerso el tejido, fueron agregadas de 10 a 35 gotas de solución reveladora. Después de agregada la solución reveladora se agitó suavemente y se dejó por 3 min hasta que el tejido tomó color café oscuro, después las láminas fueron enjuagadas con la solución de amonio al 1% (fue utilizada la misma que en el enjuague anterior). Por último, las láminas fueron enjuagadas con agua destilada y sumergidas en tiosulfato de sodio al 5% por 5 min, enjuagadas con agua destilada, deshidratadas con alcoholes, aclaradas con xilol y montadas con resina sintética (Anexo III).

La solución reveladora se preparó añadiendo a 100 ml de agua destilada, en la siguiente secuencia: 20 ml de formalina al 10 %, 10 µl de ácido nítrico, 0.5 gr de ácido cítrico con agitación suave.

IV.- Inmunohistoquímica anti-PrP^{sc}, microscopía de luz.

Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena los cortes fueron sumergidos en una solución de H₂O₂ al 2.6%, por 15 min, mientras se agitaba de manera suave y constante. Las láminas fueron enjuagadas con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (Anexo IV).

Para reactivar los epítopes de la PrP^{sc}, que posiblemente quedaron bloqueados

por el proceso de fijación, los cortes fueron sumergidos en una solución amortiguadora de citratos pH 6.0 (Anexo V) y en esta solución fueron sometidos a calentamiento en horno de microondas a 750 watts por 3.5 min, se les dejó enfriar por 20 min y se enjuagaron con PBS. Con el fin de bloquear sitios con afinidad inespecífica por moléculas globulares, los cortes fueron sumergidos en una solución de albúmina sérica bovina libre de IgGs (Sigma) al 2% en PBS durante 20 min. Los cortes fueron lavados con PBS.

Para disminuir la tensión superficial de los líquidos sobre los cortes, que pudiera interferir en la accesibilidad de los anticuerpos a la PrP^{sc}, los cortes fueron sumergidos en una solución de triton X-100 (Sigma) al 0.2% en PBS, durante 10 min y lavados con PBS. Para disminuir el derrame de las soluciones en los siguientes pasos, lo que podría provocar que el tejido se seque y los anticuerpos se precipitaran y adhirieran inespecíficamente, las zonas periféricas a los cortes fueron subrayadas con un plumón de tinta hidrofóbica (Sigma) y fueron mantenidas en PBS. Posteriormente, se adicionaron 150µl del anticuerpo primario = anti-PrP^{sc} 27-30kDa policlonal de cabra, por cada corte (Chemicon, Internacional Inc.) dilución 1:100 en PBS. Las láminas permanecieron con el anticuerpo primario en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 hrs, transcurrido este tiempo fueron lavadas con PBS.

Se colocó sobre los cortes el anticuerpo secundario = anti-cabra conjugado con la vitamina biotina (Chemicon, Internacional Inc.) de conejo, dilución 1:100 en PBS pH 7.4. Las láminas permanecieron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1.5 hrs. Las láminas fueron enjuagadas. La siguiente solución colocada sobre el tejido fue la estreptavidina (molécula que presenta alta afinidad por la biotina) conjugada con la enzima peroxidasa (Sigma) dilución 1:60 en PBS en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 min. Las láminas fueron enjuagadas con PBS.

Para hacer visible el sitio donde hubo unión entre la biotina conjugada al

anticuerpo secundario y la estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa, se utilizó la diaminobencidina (DAB) (PRECAUCIÓN SUSTANCIA CARCINOGENICA). Las láminas se sumergieron una solución d DAB al 0.03% en agua destilada, se esperó un minuto y se agregaron 400µl de H₂O₂, por cada 5° ml de solución que al ser degradado por la enzima peroxidasa libera los oxigenos requeridos para la oxidación de la DAB. Se agitó de manera suave y constante hasta que se observó el cambio en el color del tejido, de beige a café.

Para eliminar la propiedad carcinogénica, la solución de DAB utilizada fue vertida un recipiente con cloro. Las láminas fueron enjuagadas con agua corriente por 5 min y los núcleos celulares se tiñieron mediante la inmersión de las láminas en hematoxilina de Gill durante 15 seg. Por último, los cortes fueron enjuagados con agua corriente, deshidratados con alcoholes, aclarados con xilol y montados en resina sintética (Anexo III).

V.- Histoquímica con lectinas, microcopía de luz.

Los cortes fueron sumergidos en agua destilada y se adicionaron 400µl de H₂O₂ al 30% por cada 50 ml de agua destilada. Las láminas con los cortes permanecieron inmersas en esta solución durante 15 min, mientras se agitaba de manera suave y constante. Las láminas fueron enjuagadas con PBS (Anexo IV).

Procedencia	Abreviación	Especificidad
<i>Maackia amurensis</i>	MAA	Neu5Ac α 2,3
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	Neu5Ac
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	Neu5Ac α -2,6 Gal/Gal NAc
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	MRL	Neu 5,9 Ac2
<i>Arachys hypogeeae</i>	PNA	Gal- β -1,3-GalNAc
<i>Amaranthus leucocarpus</i>	ALL	Gal β 1,3GalNAc α 1,0 Ser/Thr y GalNAc α 1,0Ser/Thr

Tabla 2. Lectinas utilizadas en este trabajo.

Las láminas fueron sumergidas en una solución de albúmina sérica bovina libre de IgGs (Sigma) al 2% en PBS durante 20 min y fueron enjuagadas con PBS pH 7.4. Los cortes fueron sumergidos en una solución de tritón X-100, surfactante de pH neutro (Sigma) al 0.2% en PBS, durante 10 min y fueron enjuagados con PBS pH 7.4. Para conservar la estructura y función de las lectinas a partir de este paso fue utilizado PBS Ca^{2+} al .0016%, y hasta la incubación con las lectinas. Los portaobjetos fueron escurridos ligeramente, fue subrayada la zona periférica a los cortes con el plumón de tinta hidrofóbica, sobre los cortes fueron agregadas dos gotas de PBS Ca^{2+} . Se sustituyeron las dos gotas de PBS Ca^{2+} por 150 μ l de cada una de las distintas lectinas conjugadas con biotina, MAA, LPA, SNA, LPA (EY laboratories, Inc) ALL y MRL (Vázquez y cols., 1993; Zenteno, 1998), dilución 1:100 en PBS Ca^{2+} . Las láminas permanecieron en cámara húmeda a 37°C durante 2 hrs y fueron enjuagadas con PBS.

La siguiente solución colocada sobre el tejido fue la estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa (Sigma) dilución 1:60 en PBS en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 min. Las láminas fueron enjuagadas con PBS. Para hacer visible la zona donde hubo reconocimiento entre la biotina y la estreptavidina peroxidasa, se utilizó la diaminobencidina (DAB). Las láminas se sumergieron en 50 ml de agua destilada en la que previamente se habían disuelto 0.015 gr de DAB, se esperó un minuto y se agregaron 400 μ l de H_2O_2 , se agitó de manera suave y constante hasta que se observó un vire del color del tejido de color beige a café. La solución de DAB utilizada fue desechada en un recipiente con cloro. Las láminas se enjugaron por 5 min con agua y se tñieron los núcleos celulares, mediante una inmersión de las láminas en hematoxilina de Gill, durante 15 seg. Por último, los cortes fueron enjuagados con agua corriente, deshidratados con alcoholes, aclarados con xilol y montados en resina sintética (Anexo III).

VI.- Doble marcaje anti-PrP^{sc} y lectinas, microscopía confocal.

Esta técnica resulta de la combinación de las técnicas de inmunohistoquímica e histoquímica de lectinas. Su aplicación permite observar en la misma preparación dos reconocimientos en forma simultánea, diferenciables entre sí por el color, al observarlas en el microscopio confocal. El color depende de la longitud de onda a la que emite la molécula fluorescente que se encuentra conjugada a la estreptavidina.

Los cortes fueron sumergidos en una solución de albúmina sérica bovina libre de IgGs al 2% en PBS durante 20 min y fueron enjuagados con PBS. Los cortes fueron sumergidos en una solución de tritón X-100, surfactante de pH neutro al 0.2% en PBS pH 7.4, durante 10 min y fueron enjuagados con PBS pH 7.4 y luego con PBS Ca²⁺. A los cortes se les agregaron 150 µl de cada una de las distintas lectinas conjugadas con biotina: MAA, ALL, LPA, SNA y LPA dilución 1:100 en PBS Ca²⁺. Las láminas permanecieron en cámara húmeda a 37°C durante 2 h y se enjuagaron con PBS. Posteriormente fue colocada sobre el tejido la estreptavidina fluorocescinada (FITC) (Sigma) con absorción a 280 nm y emisión a 495 nm, dilución 1:60 en PBS. Las láminas permanecieron en cámara húmeda, en oscuridad a 37°C durante 2 h. A partir de este paso se recomienda, para disminuir la pérdida de fluorescencia, trabajar con luz tenue. Los cortes fueron enjuagados con PBS. A los cortes se les agregaron 150 µl del anticuerpo primario = anti-PrP^{sc} 27-30kDa policlonal de cabra (Chemicon, International Inc.), dilución 1:100 en PBS. Los cortes permanecieron con el anticuerpo primario en cámara húmeda en oscuridad, a temperatura ambiente durante 2 hrs, transcurrido este tiempo fueron enjuagados con PBS. Posteriormente, se colocó el anticuerpo secundario = anti-cabra conjugado con la vitamina biotina, de conejo, dilución 1:100 en PBS. Las láminas permanecieron en cámara húmeda, en oscuridad a temperatura ambiente, durante 1.5 h. Los cortes fueron enjuagados con PBS. La última sustancia en ser agregada sobre los cortes fue la estreptavidina conjugada con CY3 (Sigma) con

absorción a 552 nm y emite a 565 nm, dilución 1:60 en PBS, en temperatura ambiente, en oscuridad, durante 30 min. Por último, las láminas fueron montadas con 10 µl de medio especial para evitar la pérdida de fluorescencia, Vectashiel (Vector laboratories), se les dejó secar por 10 min y los bordes de los cubreobjetos fueron sellados con barniz de uñas. Las láminas fueron guardadas en oscuridad, hasta que fueron observadas en un microscopio confocal BioRad, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

RESULTADOS

Con la técnica de hematoxilina y eosina se observó que el encéfalo con el síndrome de GSS presenta un mínimo grado de espongirosis, la muerte celular está presente pero también es discreta. Se observaron zonas pequeñas con mayor intensidad de la eosina, en rosa, presentes en mayor cantidad en la capa molecular del cerebelo (Lámina I, Figura A). En la capa de la granulosa del cerebelo con GSS puede observar mayor pérdida de neuronas. En la capa de las neuronas de Purkinje se observaron depósitos intracitoplasmáticos teñidos de color rosa intenso y degeneración de las neuronas que conforman esta capa (Lámina I, Figura B). La tinción con azul de toluidina permitió identificar los depósitos de la PrP^{sc} en color azul intenso, tanto los intracitoplasmáticos como las placas, en contraste del color claro del resto del parénquima (Lámina I, Figura D) y de los depósitos de la proteína amiloide-β en los casos con la enfermedad de Alzheimer. Con la técnica argéntica se observó impregnación de los cuerpos neuronales y de sus prolongación, sin embargo los depósitos de la PrP^{sc} (correspondientes a los detectados con el anticuerpo anti-PrP^{sc}) se observaron totalmente carentes del precipitado de plata (Lámina I, figura C).

Mediante la aplicación de la técnica inmunohistoquímica anti-PrP^{sc} se obtuvo un reconocimiento positivo de los depósitos de la PrP^{sc} en forma de placas (principalmente por el centro) (Lámina I, Figura E y F; Lámina III, Figura F) característicos en la

enfermedad de GSS, además de depósitos intracitoplasmáticos en neuronas y neuronas de Purkinje, en el endotelio de vasos sanguíneos y en las meninges.

Mediante la histoquímica con la lectina MAA observamos reconocimiento positivo por placas, depósitos intracitoplasmáticos, endotelio de vasos sanguíneos y por el neuropilo (Lámina II, Figura A). Las lectinas ALL, PNA, SNA y LPA presentaron reconocimiento positivo por los mismos depósitos que reconoció el anticuerpo anti-PrP^{sc} (Tabla 4). Todas reconocieron leptomeninges y vasos sanguíneos. Sin embargo, cada una de las lectinas presentó diferente afinidad por los distintos depósitos de la PrP^{sc}. La lectina ALL reconoció con mayor intensidad la periferia de las placas (Lámina II, Figura D), la PNA la periferia las placas (Lámina II, Figura B), microplacas y los depósitos intracelulares en las neuronas de Purkinje (Lámina II, Figura C). La lectina LPA reconoció la periferia de las placas y los depósitos intracelulares en las neuronas de Purkinje. La lectina SNA reconoció con gran intensidad sólo el centro de las placas (Lámina II, Figura E). La lectina MRL presentó reconocimiento negativo por todas las estructuras del tejido (Lámina II, Figura F).

Estructura	MAA	ALL	LPA	PNA	SNA	MRL
Periferia de las placas	++	+++	+	++	+	--
Centro de las placas	+	+	+	+	+++	--
Micro-placas	+	++	+	++	+	--
Neuronas de Purkinje	++	++	+	++	--+	--
Neuronas	+	+	+	+	--+	--
Vasos sanguíneos	++	+	+	+	+++	--
Meninges	+	--+	+	+	+	--
Cerebros normales de vasos sanguíneos)	++	--	--	--	--	--

Tabla 4. Reconocimiento observado por las distintas lectinas el tejido cerebelar de un caso con GSS.

En los cerebros normales las lectinas no reconocieron estructuras intracitoplasmáticas ni en forma de placas, excepto con la lectina MAA que reconoció el endotelio de los

vasos sanguíneos. En los cerebros con AD se presentó reconocimiento por depósitos de la proteína amiloide- β con las lectinas SNA, LPA, MRL, ALL y PNA. Las marañas neurofibrilares fueron reconocidas por las lectinas LPA, MAA, SNA, MRL, ALL y PNA.

Doble marcaje para microscopía confocal, lectinas y PrP^{sc}

La aplicación del doble marcaje, lectinas y anti-PrP^{sc} 27-30KDa, y la sobreposición de las imágenes obtenidas en los canales verde y rojo, mediante microscopía confocal permitió observar una mínima colocalización con la lectina MAA y los distintos depósitos de la PrP^{sc} en forma de placas (Lámina III, Figuras B) y nula en los depósitos intracitoplasmáticos (Lámina III, Figura E). Las lectinas ALL (Lámina III, Figura D), SNA (Lámina III, Figura A), LPA y PNA (Lámina III, Figura C) presentaron ausencia de colocalización con los depósitos de la PrP^{sc} en forma de placas y con los intracitoplasmáticos. Sin embargo, se observó colocalización intensa de todas las lectinas utilizadas en este trabajo, excepto MRL, con los depósitos de la PrP^{sc} en el endotelio de los vasos sanguíneos *Tabla 5*.

LECTINAS	PLACAS	VASOS SANGUÍNEO
MAA	+	+++
ALL	--	+++
LPA	--	+++
SNA	--	+++
PNA	--	+++
MRL	--	--

Tabla 5. Colocalización entre los depósitos de la PrP^{sc} y las distintas lectinas.

Lámina I

Imagen A y B Tinción H y E, cerebelo con GSS. Imagen A; capa molecular con depósitos en forma de placas (flechas), núcleos celulares en azul. Imagen B, las tres capas del cerebelo: granulosa (zona inferior), donde se observan gran número de núcleos celulares; capa de neuronas de Purkinje (zona intermedia) donde se pueden observar los vacíos en el tejido producidos por la muerte de las neuronas de Purkinje. Neurona de Purkinje con depósitos intracitoplasmáticos (flecha) que se tiñen de color rosa más intenso que el resto del tejido; y la capa molecular (zona superior) compuesta por dendritas y axones de las neuronas.

Imagen C Tinción argéntica (Método de Bielchowsky), cerebelo con GSS. Las tres capas del cerebelo donde se observa degeneración en la capa de las neuronas de Purkinje. Neurona de Purkinje con soma y dendritas impregnadas con plata (flecha). Ausencia de impregnación de los depósitos en forma de placas de la PrP^{sc} que reconoció el anticuerpo anti-PrP^{sc} (punta de flecha).

Imagen D Tinción con azul de toluidina. Cerebelo con GSS. Depósito en forma de placa (flecha) e intracitoplasmáticos en neuronas (puntas de flecha).

Imagen E y F Inmunohistoquímica anti-PrP^{sc}. Imágen E, hipocampo con GSS; reconocimiento por el anticuerpo anti-PrP^{sc} 27-30KDa (flechas), más intenso en el centro de las placas. Imagen F, cerebelo con GSS; reconocimiento por depósitos en la capa de la granulosa con el anticuerpo anti-PrP^{sc} 27-30KDa (flechas).

Lámina II.

Imagen A Cerebelo con GSS, capa molecular; reconocimiento con la lectina **MAA** de depósitos en forma de placas (flecha) y del neurópilo, dendritas y axones (punta de flecha).

Imagen B Cerebelo con GSS, capa molecular; reconocimiento con la lectina **PNA** de depósitos en forma de placas, menor en la zona central (puntas de flecha) y más intenso en la zona periférica (flechas).

Imagen C Cerebelo con GSS, capa de las neuronas de Purkinje, reconocimiento con la lectina **PNA**, de depósito intracitoplasmático en una neurona de Purkinje (flecha).

Imagen D Cerebelo con GSS, capa molecular, reconocimiento con la lectina **ALL** de depósitos en forma de placas, menor en la zona central (puntas de flecha) y más intenso en la zona periférica (flechas).

Imagen E Hipocampo con GSS, capa molecular; reconocimiento con la lectina **SNA** que se restringe al centro de la placa (flechas) y reconocimiento en una vaso sanguíneo (punta de flecha).

Imagen F Las tres capas del cerebelo, con GSS. Ausencia de reconocimiento por la lectina **MRL** por toda estructura del tejido, núcleos celulares en azul.

Lámina III

Microscopia confocal. Distintas lectinas en color verde y la PrP^{Sc} de 27-30kDa en rojo. Color amarillo interpretado como colocalización.

Imagen A Hipocampo con GSS. Ausencia de colocalización de doble marcaje con la lectina SNA y el anticuerpo PrP^{Sc} (flecha). Colocalización en el endotelio de vasos sanguíneos (punta de flechas).

Imagen B Cerebelo con GSS, capa molecular, colocalización mínima del doble marcaje con la lectina MAA y la PrP^{Sc} (flecha). Colocalización intensa en el endotelio de un vaso sanguíneo (punta de flecha).

Imagen C Cerebelo con GGS, capa molecular. Ausencia de colocalización por la lectina PNA y la PrP^{Sc} (flecha). Colocalización en el endotelio de un vaso sanguíneo (punta de flecha).

Imagen D Cerebelo con GSS, capa molecular Ausencia de colocalización con la lectina ALL y la PrP^{Sc} (flecha). Colocalización en el endotelio de un vaso sanguíneo (punta de flecha).

Imagen E Cerebelo con GSS, célula de Purkinje con depósito intracitoplasmático. Ausencia de colocalización con la lectina MAA y la PrP^{Sc} (flecha). Colocalización en el endotelio de un vaso sanguíneo (punta de flecha).

Microscopia de luz

Imagen F Cerebelo con GSS, capa molecular del cerebelo. Técnica inmunohistoquímica depósito de la PrP^{Sc} en forma de placa (flecha). Reconocimiento más intenso en el centro de la placa.

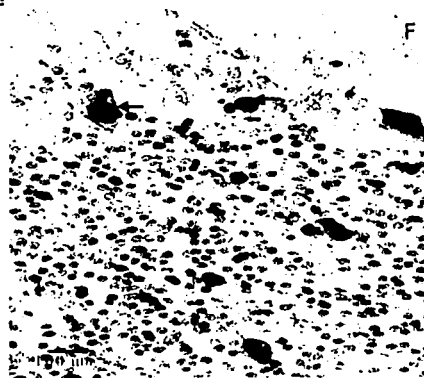
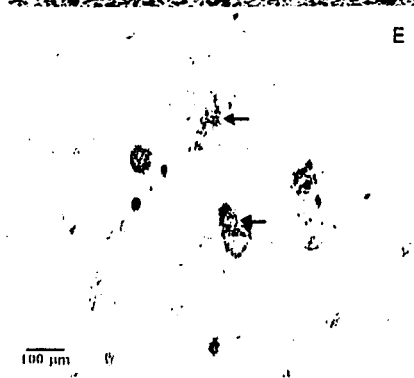
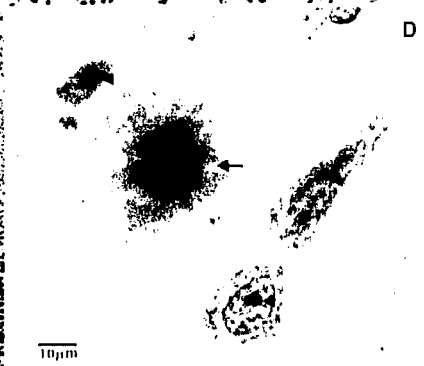
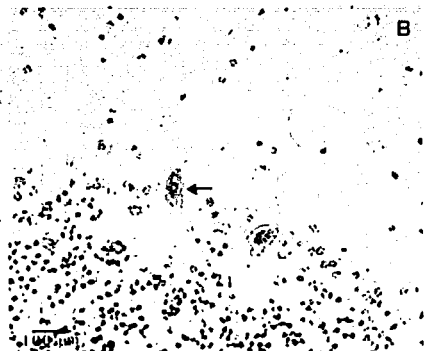
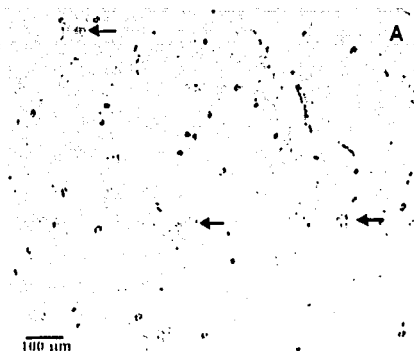


Lámina 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

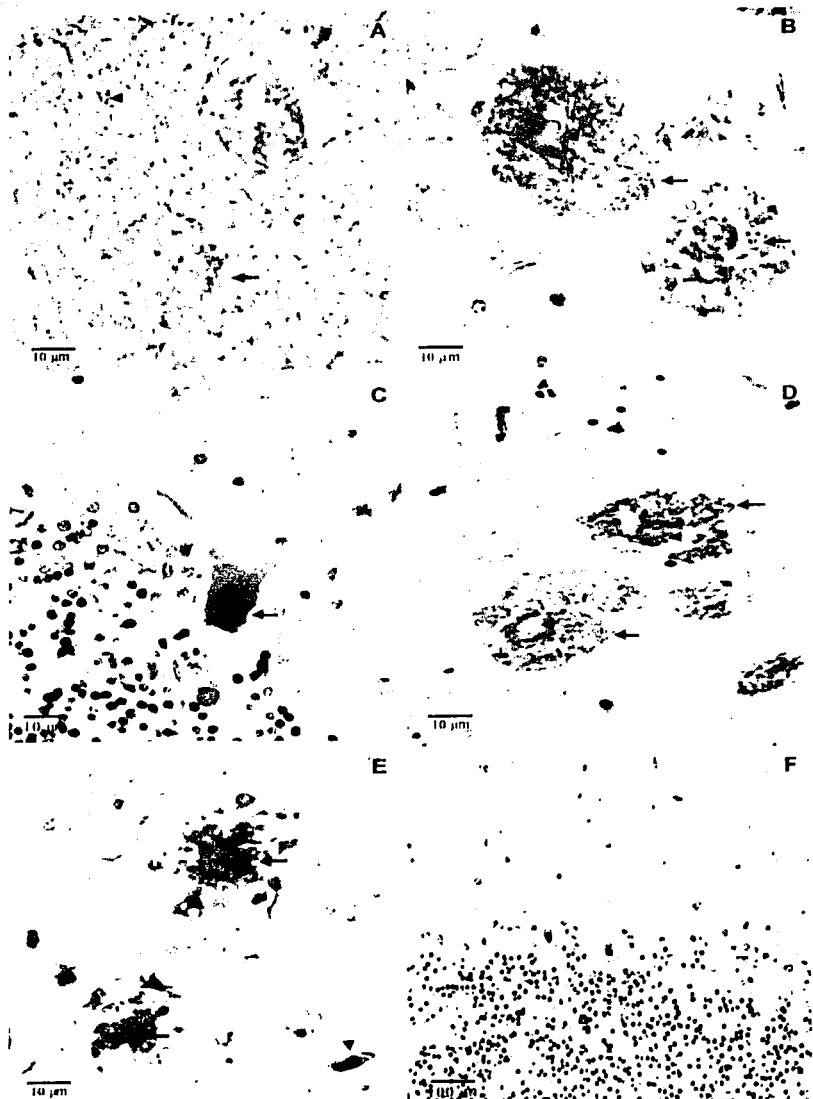


Lámina II

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

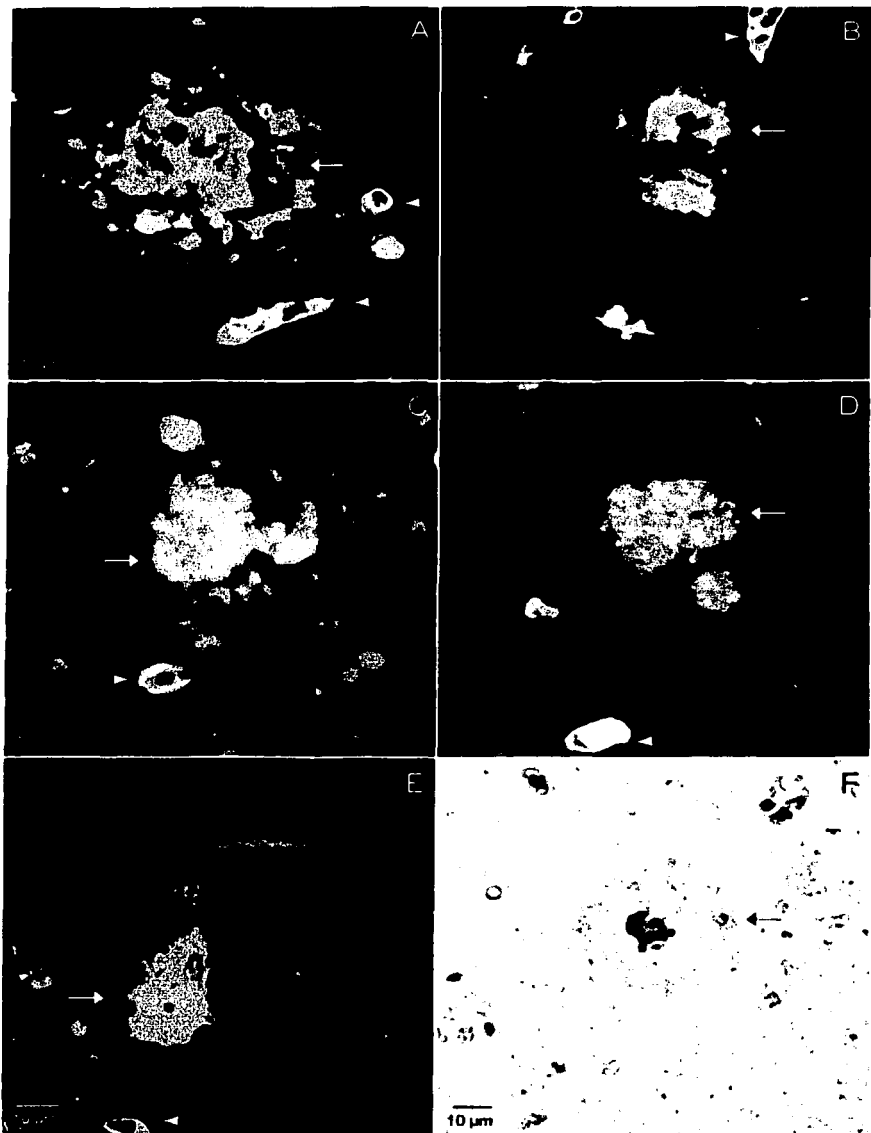


Lámina III

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la acumulación de una proteína alterada conformacionalmente, la proteína prion PrP^{sc}, que procede de su isoforma normal PrP^c. La PrP^{sc} presenta propiedades de agregación y resistencia a proteasas, se acumula en el SNC formando depósitos intracelulares y extracelulares en forma de placas (Brown y cols., 1994).

Una de las hipótesis para explicar el cambio conformacional de la proteína prion es la alteración de algún proceso postraducciona (Zahn y cols., 2000). Uno de los mecanismos postraduccionales más importantes en el establecimiento de la conformación y función de una proteína extracelular es la glicosilación.

La glicosilación se lleva a cabo en el RE y en el AG, realizada por enzimas que pueden transferir a la proteína cadenas de carbohidratos, así como añadir o eliminar los carbohidratos por monómeros. Las variaciones estructurales de estos dos organelos se relacionan con los tipos de enzimas que presentan, y como consecuencia última esto se traduce en el tipo y posición de los carbohidratos en las cadenas y en el tamaño de las mismas (Cummings, 1992; Schachter, 1995).

Variaciones en la expresión de O-glicanos (en tipo y cantidad), especialmente de ácido siálico y sus derivados, han sido observadas durante el desarrollo neuronal, en patologías cancerosas (las células que forman el tumor regularmente exhiben gran cantidad de oligosacáridos siálicos) (Osborn y Khan, 2000) y en los depósitos en forma de placas y en vasos sanguíneos de la proteína amiloide- β en la enfermedad de Alzheimer (Guevara y cols., 1998). El ácido siálico y sus derivados, junto con otros carbohidratos, son adicionados en las últimas etapas de la glicosilación de las proteínas destinadas a la cara extracelular de la membrana plasmática, por lo que estos carbohidratos constituyen las señales más específicas para el establecimiento de reconocimiento y comunicación celular (Osborn y Khan, 2000).

Distintas glicoproteínas que poseen gran cantidad de O-glicanos se agrupan bajo el nombre de mucinas, estas son expresadas en la superficie celular y excretadas por numerosos tipos celulares (Gaffney, 1992). La técnica de azul de toluidina es una técnica para observar depósitos de carbohidratos del tipo mucinas y muco polisacáridos. Se ha comprobado que la técnica de azul de toluidina tiñe de manera selectiva depósitos de la PrP^{sc}, tanto intracitoplasmáticos como las placas extracelulares, con una sensibilidad del 62%, con respecto al reconocimiento por el anticuerpo anti-PrP^{sc} 27-30kDa y no tiñe los depósitos del amiloide-β de la EA (Sánchez y cols., 2001). Sin embargo, a pesar de la tinción positiva con azul de toluidina de los depósitos de PrP^{sc} y de que los modelos teóricos de las PrP^c indican posibles sitios para O-glicosilación, no se han encontrado O-glicanos ni en la PrP^c y PrP^{sc} de hámster sirio (Rudd y cols., 2001).

La técnica de impregnación argéntica, método de Bielschowsky que tiñe neurofibrillas (dendritas y axones) es utilizada para observar marañas neurofibrilares y placas seniles, resultando útil para el diagnóstico de la EA (Prophet y cols., 1992). La ausencia de impregnación argéntica de los depósitos de la PrP^{sc} mediante esta técnica (Lámina I, Figura C), junto con la tinción diferencial de los depósitos de amiloide-β y PrP^{sc} con el azul de toluidina podría implicar que ambos depósitos poseen diferencias químicas que no solo radican en el componente proteico principal de los mismos, sino en la naturaleza de las moléculas (y en glicosilación de estas) que se encuentran asociadas a los depósitos.

La aplicación de inmunohistoquímica anti-PrP^{sc} nos permitió establecer con certeza que los depósitos en forma de placas observados con las técnicas histoquímicas están constituidos en su mayor parte, por la PrP^{sc} de 27-30 kDa (Lámina I, Figuras E, F; Lámina III, Figura F), también fueron observados depósitos intracelulares en neuronas de Purkinje, en vasos sanguíneos y en las meninges. Bajo el criterio de mayor cantidad de depósitos de la PrP^{sc}, fue que elegimos el cerebelo debido a que es el área más

afectada en el síndrome de GSS (Brown y cols., 1994) y el hipocampo, que también presentó gran cantidad de placas, para aplicar las técnicas histoquímicas de lectinas y el doble marcaje PrP^{sc}-lectinas.

La aplicación de la técnica histoquímica de lectinas nos permitió determinar la presencia anormal y la naturaleza de residuos O-glicosilados, incluyendo el ácido siálico y dos de sus derivados, asociados de manera predominante a los depósitos de la PrP^{sc}, hallazgo que sugiere la presencia de alteraciones en la expresión de las enzimas glicosiltransferasas y asociación de esta alteración con la patogénesis de los depósitos de la PrP^{sc}. Queda por establecer en que tipo celular se está presentando la alteración en los procesos de O-glicosilación, es decir alteración en el funcionamiento del aparato de Golgi, y si la identidad de este tipo celular coincide con la de las células que producen la PrP^{sc} de los distintos depósitos.

El α -NeuAc 2-3, reconocido con la lectina MAA se encontró presente en todo el tejido incluyendo todos los depósitos de la PrP^{sc} (Lámina II, Figura A). Los carbohidratos Gal β 1,3 GalNAc α 1,0 Ser/Thr y GalNAc α 1,0 Ser/Thr, reconocidos con ALL (Lámina II, Figura D); Neu5Ac, reconocido con LPA y β -D-gal (1-3) galNAc, reconocido con PNA, presentaron reconocimiento por los depósitos intracelulares de la PrP^{sc} (Lámina II, Figura C) y en forma de placas, aunque sólo reconocieron la periferia de las placas y las placas pequeñas (microplacas) (Lámina III, Figuras B y D). Por el contrario, el residuo α -NeuAc (2-6) gal/galNac reconocido con la lectina SNA se presentó específicamente en el centro de las placas y no en los depósitos intracelulares (Lámina III, Figura E). La presencia diferencial de los O-glicanos en los depósitos de la PrP^{sc} sugiere que esta disposición pudiera tener relación con el curso temporal de la formación y de la maduración de los depósitos de la PrP^{sc}.

La microcopia confocal nos permite observar de manera nítida dos reconocimientos al mismo tiempo, sobre la misma muestra de tejido. En este caso los reconocimientos

fueron hechos con las distintas lectinas y el anti-PrP^{Sc}. Se observa co-localización si ambos reconocimientos quedan sobrelapados y por lo tanto, las moléculas reconocidas se encuentran en estrecha asociación espacial. En este trabajo la presencia de co-localización nos podría indicar que los residuos O-glicosilados se encuentran en alguna de las cadenas de carbohidratos adicionadas a la proteína PrP^{Sc} o asociadas a moléculas muy cercanas a la PrP^{Sc}.

La co-localización que fue observada con la lectina MAA (sólo para placas y vasos sanguíneos) y el anti-PrP^{Sc} (Lámina III, Figura B) pudiera ser explicada por la presencia del residuo α 2-3NeuAc como parte de los componentes del ancla de glicosylphosphatidylinositol (GPI). Esto debido a que han sido descritos residuos de ácido siálico en el ancla de GPI de la PrP^{Sc} (Rudd y cols., 2001).

Por otra parte, se observó co-localización intensa entre el anti-PrP^{Sc} y las lectinas LPA, PNA, ALL y SNA en los depósitos de los vasos sanguíneos (Lámina II, Figuras A, C y D) sin embargo, se observó ausencia de co-localización con todos los depósitos en forma de placas y en los intracelulares. Si los O-glicanos estuvieran implicados en la formación de los depósitos de la PrP^{Sc} la afinidad diferencial de las lectinas ALL, SNA, LPA, y PNA por los distintos depósitos de PrP^{Sc} sugeriría la existencia de diferentes mecanismos de agregación. Por la ausencia de co-localización entre el anti-PrP^{Sc} y las distintas lectinas en los depósitos en forma de placas podemos sugerir que estos no se encuentran en las cadenas de carbohidratos de la PrP^{Sc}. Los residuos de carbohidratos podrían estar en las cadenas de carbohidratos de otras moléculas asociadas de manera específica a la PrP^{Sc}. Si éste fuera el caso, las moléculas asociadas a los depósitos de la PrP^{Sc} serían las que están exhibiendo las alteraciones en el proceso de glicosilación. Aunado a esto, la identidad de las moléculas asociadas a los depósitos de la PrP^{Sc} podrían caer dentro del grupo de moléculas que han sido propuestas como mediadoras del cambio conformacional de la PrP^{Sc}. Al respecto, se ha demostrado que las

chaperonas moleculares como GroEL y HspB104 facilitan el cambio conformacional de PrP^c a PrP^{sc} (Debburman y cols., 1997). Además, se conoce un fenómeno similar en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que expresa un fenotipo psi⁺, al ser alterada la expresión por delección de su chaperona molecular (Sup35p). La proteína psi⁺ es alterada conformacionalmente, lo que conduce a su insolubilidad y agregación intracitoplásmica (Chacinska y cols., 2001).

Otra característica neuropatológica compartida por la enfermedad EA y las EPRs, además de la presencia de placas amiloides, es que las proteínas principales de los depósitos en forma de placas (amiloide- β y PrP^{sc}, respectivamente) también se depositan en los vasos sanguíneos (Bueé y cols., 1997), como se observó en este trabajo (Lámina III, Figuras A-D). En la EA a esta característica se le denomina angiopatía congofílica, ya que estos depósitos también se tiñen con rojo Congo, y se ha limitado su posición al basamento vascular, zona que se encuentra entre la célula endotelial y las prolongaciones de los astrocitos (Bueé y cols., 1997). Por esta razón en este trabajo se ha limitado el nombrar la posición de los depósitos a los vasos sanguíneos y no especificar en el endotelio, ya que nuestros resultados (incluyendo la resolución de nuestras imágenes) no permite determinar la posición exacta de los O-glicanos. Se ha descrito que el amiloide- β , induce a las células endoteliales a producir el radical superóxido y otra molécula con efecto tóxico para las neuronas, denominada factor tóxico derivado del endotelio (FTDE). Estos datos apoyan la hipótesis de que las alteraciones en los vasos sanguíneos del cerebro son un factor esencial en la etiopatogénesis de distintos desordenes neurodegenerativos, como la EA, las EPRs, las demencias frontotemporales, la demencia por SIDA, la demencia en el síndrome de Down, entre otras (Grammas y cols., 1997). El encontrar co-localización de las distintas lectinas (Tabla 5) con los depósitos de la PrP^{sc} en los vasos sanguíneos nos sugiere la participación de los carbohidratos en las alteraciones vasculares y abre la posibilidad

las alteraciones en el proceso postraduccional de O-glicosilación se puedan encontrar algún componente celular que conforme la barrera hematoencefálica. Alteraciones en la función del aparato de Golgi, en la EA también han sido sugeridas al encontrar que en las cisternas-trans del aparato del Golgi se forma gran cantidad de la la forma estable del principal fragmento de los depósitos de A β , el A β de 42 aminoácidos (Greenfield y col., 1999).

Para conocer el papel de la O-glicosilación en los desórdenes neurodegenerativos es necesario determinar la identidad de las moléculas sobre las que se encuentran las alteraciones en la O-glicosilación, así como estudiar los mecanismos por los cuales este tipo de carbohidratos se adicionan, y como las modificaciones en estos procesos podrían provocar el cambio de conformación de una proteína celular normal a una patológica mediante interacciones moleculares anormales, o participar en alteraciones funcionales de las neuronas, probablemente en el reconocimiento y comunicación celular, que conducen a los procesos neurodegenerativos.

ANEXOS

Anexo I

Solución acuosa de formaldehído (Fijador)

Agua destilada 900ml

formaldehído comercial 100ml

La cantidad utilizada, debe ser aproximadamente, 10 a 20 veces el volumen de la muestra.

Anexo II

Adherente de silano (SIGMA)

Silano 2ml

Acetona 98ml

Lavar los portaobjetos con detergente de pH neutro, enjuagar con agua destilada, dejar secar completamente. Sumergir en la mezcla de silano al 2% en acetona, durante 2 min.; Posteriormente, enjuagar 2 veces con agua destilada. Secar completamente a temperatura ambiente o en estufa. La solución es reutilizable, mientras no cambie a color amarillo rojizo; mantener en refrigeración.

Anexo III

Deshidratación e inclusión en parafina

⇒ Agua destilada por 30 seg

⇒ Alcohol 96% por 3 min

⇒ Alcohol 96% por 3 min

⇒ Alcohol absoluto por 3 min

⇒ Alcohol absoluto por 3 min

⇒ Xilol absoluto, alcohol 96% (1:1) por 3 min

⇒ Xilol absoluto por 10 min

⇒ Xilol absoluto por 10 min

⇒ Parafina fundida por 1 h

⇒ Parafina fundida por 1 h

⇒ Inclusión en parafina fundida y solidificación de la parafina con frío

Desparafinado y rehidratación de los cortes del tejido.

⇒ Xilol absoluto por 10 min

⇒ Xilol absoluto por 10 min

⇒ Xilol absoluto, alcohol absoluto (1:1) por 3 min

⇒ Alcohol absoluto por 3 min

⇒ Alcohol absoluto por 3 min

⇒ Alcohol 96% por 3 min

⇒ Alcohol 96% por 3 min

⇒ Agua destilada por 30 seg

Deshidratación, aclaración y montaje de los cortes de tejido

⇒ Agua destilada por 30 seg

⇒ Alcohol 96% por 3 min

⇒ Alcohol 96% por 3 min

⇒ Alcohol absoluto por 3 min

⇒ Alcohol absoluto por 3 min

⇒ Xilol absoluto, alcohol absoluto (1:1) por 3 min

⇒ Xilol absoluto por 10 min

⇒ Xilol absoluto por 10 min

Para montar permanentemente el tejido fue agregada una gota de resina y se colocó el cubre objetos, se dejó secar por 24 horas. En el caso del medio de montaje para microscopía confocal, fue agregado 10-15 μ l de Vecta-shield (Vector) por cada lámina, después de colocado el cubreobjetos se sellaron los bordes con barniz de uñas y fueron almacenados en oscuridad.

Anexo IV

Buffer de Fosfatos, pH 7.4 (PBS)

Solución A

Fosfato monosódico $\text{Na H}_2\text{PO}_4$, 175.2 gr por 1L (se recomienda preparar 250 ml de solución A por cada litro de solución B).

Solución B

Fosfato disódico $\text{Na}_2\text{H PO}_4$ (56.8 gr por cada 1L)

Mezclar 81% de la solución B y 19% de la solución A, pH 7.4

Agregar 17.6 gr. de Cloruro de Sodio, NaCl_2 y 8gr de Cloruro de potasio KCl_2 por cada l. = Solución concentrada 2X, diluir 1:1 con agua bidestilada.

Anexo V (Reactivación antigénica con buffer de citratos y calor).

Amortiguador de citratos 10mM, pH6

Solución stock Ácido: 0.1 M de ácido cítrico

Solución Stock Base: 0.1 M de citrato de sodio

Solución de trabajo: 9ml de A+41 ml de B. Llevar a 500ml con agua desionizada.

Procedimiento:

Inmersión de los cortes en un vaso de coplin con buffer de citratos, el vaso se colocó en baño maría y fue calentado en microondas durante 3,5 min, a 750 watts, hasta ebullición. Evitar que se sequen los cortes si es necesario agregar más amortiguador. Se dejan enfriar a temperatura ambiente por 20 min. Se enjuagan con PBS pH 7, para continuar con la técnica.

Nota: Para evitar que se formen burbujas entre las láminas, el espacio entre éstas deberá ser mínimo de 4mm, aproximadamente.

50 ml de la solución, fueron agregados 400µl de H₂O₂. Se agitó suavemente hasta que los cortes tomaron un color marrón. La solución de DAB fue vertida en un recipiente con cloro y los cortes fueron enjuagados con agua corriente, durante 5 min, para proseguir con la contra tinción o montaje de las láminas

Un indicio que el reactivo DAB ha sido desnaturalizado, ha perdido su propiedad carcinogénica, es el cambio de su color; de café oscuro a amarillo, momento en el cual puede ser desechado.

Anexo VI

Revelador de Diaminobencidina DAB*, en PBS Tritón.

Precaución: Este reactivo posee propiedades carcinogénicas, por lo que su uso requiere protección, doble guante, doble cubre boca y lentes, cualquier material contaminado debe ser limpiado con cloro, hasta no observar residuos oscuros.

Solución:

Diaminobencidina (DAB) (SIGMA) 3.0 miligramos por cada 10 ml de Tritón X-100 (SIGMA) al 2% en PBS 7.4

Procedimiento:

Los cortes del tejido fueron inmersos en la solución de DAB, posteriormente; por cada

REFERENCIAS

- Aguzzi A, Bitfler T, Klein M, Brandner S, Raeber A, Flechsig E and Weissmann C (1997) Neurotoxicity and Neuroinvasiveness of prions. *Brain Pathology* 7: 1137-1138
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and JD Watson (1993) Tráfico vesicular mediante las rutas secretora y endocítica. En: Biología Molecular de La célula. Omega Barcelona.
- Alper T, Haig D and Clarke MC (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22:278-284
- Baker HF and RM Ridley (1996) Prion diseases. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Balanzat FC. Demencias por priones En: Alberca R y S López-Pousa (1998) Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Médica Pánamericana, España.
- Barcikowska M, Liberski PP, Boellaard JW, Brown P, Gajdusek DC and Budka H (1993) Microglia is a component of the prion amyloid plaque in the Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Acta Neuropathol.* 85;6:623-627
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKindley MP, Prusiner SB and Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-428
- Belay ED (1999) Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Ann. Rev. Microbiol.* 53:283-314
- Bell JE and Ironside JW (1993) Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. *Br. Med. Bull.* 49: 738-777
- Bendheim PE, Bockman MP, McKinley MP, Kingsbury DT and Prusiner SB (1985) Scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins share physical properties and antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:997-1001
- Beyer TA, Sadler JE, Rearick JI, Paulson JC and Hill RL (1981) Glycosyltransferases and their use in assensing oligosaccharide structure and structure-fuction relationships. *Adv. Enzimol.* 52: 23-175
- Bolton DC, MacKinley M and Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218;24:1309-1310
- Brown DR (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *TRENDS Neurosci.* 24; 2: 85-90
- Brown P, Gibbs CJ, Rogers-Johnson P Jr., Asher DM, Sulima MP and Bacote A (1994) Human spongiform encephalopathy: the National of Health series of 300 experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* 35: 513-529
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, Mc-Conmll Y and Drummond D (1997) Transmisión to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501

- Bueé L, Hof PR and A Delacourte (1997) Brain microvascular changes in Alzheimer's disease and other dementias. In: De la Torre JC and Hachinski V (1997) Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. Annals of the New York Academy of Sciences Vol. 826
- Caughey B (1993) Protease-resistant PrP accumulation and scrapie agent replication: a role for sulphated glycosaminoglycans? *J Virol* 67:643-650
- Chacinska A, Szczesniak B, Kochneva-Pervukhova NV, Ter-Avanesyan MD and Boguta M (2001) Ssb1 chaperone is a [PSI⁺] prion-curing factor. *Curr. Genet.* 39:62-67
- Chazot E, Broussole E, Lapras CI, Battler T, Aguzzi A and Kopp N (1996) New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 347: 1118
- Clausen H and Benneth EP (1996) One family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology* 6:635-646
- Cohen FE (1999) Protein misfolding and prion diseases. *J. Mol. Biol.* 293:313-320
- Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Balwing M, Fletterick RJ and Prusiner SB (1994) Structural clues to prion replication. *Science* 264:530-531
- Cummings RD (1992) Synthesis of asparagine-linked oligosaccharides: pathways, genetics, and metabolic regulation. In: HJ Allen and EC Kisailus (eds): *Glycoconjugates*. Composition, structure, and function. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel, Hong Kong.
- DeArmond SJ and Prusiner SB (1995) Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am. J. Pathol.* 148: 785-811
- DeBurman S, Raymond G, Caughey B and Lindquist A (1997) Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13938-13943
- Diener TO, McKinley MP and Prusiner SB (1982) Viroids and prions. *Biochemistry* 79:5220-5224
- Diomede L, Sozzani S, Luini W, Algeri M, De Gioia L, Chiesa R, Lievens P, Buglani O, Forloni G, Tagliavini F and Salmona M (1996) Activation effect of a prion protein fragment (PrP 106-126) on human leucocytes. *Biochem. J.* 320: 563-570
- Endo T, Groth D, Prusiner SB and Kobata A (1989) Diversity of Oligosaccharide structures linked to asparagine of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28:8380-8388
- Furukawa H, Don-ura K, Kikkuchi H, Tateishi J and Iwaki T (1998) A comparative study of abnormal prion protein isoforms between Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome and Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Sci.* 158:71-75.
- Gabus C, Derrington E, Leblanc P, Chnalderman J, Dormont D, Swietnicki W, Morillas M, Surewicz WK, Marc D, Nandi P and Darlix J-L (2001) The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCp7 of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 276:22:19301-19309

- Gaffney E (1992) Hidratos de carbono. En: Prophet E, Mills B, Arrington JB y Sovin LH. Traducida por Hefess C y Mullick FG (1992) Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las fuerzas armadas de EUA. Washington, DC. Traducida por Hefess C y Mullick FG.
- Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 97: 943-960
- Gajdusek DC and Zigas V (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "Kuru" in the native population. *N Engl J Med* 257:974-978
- Gasset M (1996) El prion, una herejía científica en la vida cotidiana. *Fronteras de la Ciencia y Tecnología (Francia)* 13:4-6
- Ghetti B, Piccardo P, Frangione B, Bugiani O, Giaccone G, Young K, Prelli F, Farlow MR, Dlouhy S and Tagliavini F (1996b) Prion protein hereditary amyloidosis: parenchymal and vascular. *Semin. Virol.* 7:189-200
- Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, Ichimiya Y, Porro M, Perini F, Kitamoto T, Tateishi J, Seiler C, Frangione B, Bugiani O, Giaccone G, Prelli F, Goedert M, Dlouhy SR and Tagliavini F (1996a) Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with τ -positive neurofibrillary tangles: The phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Neurology* 93: 744-748
- Golfarb LG, Peterson RB, Tabaton M, Brown P and LeBlanc AC (1992) Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype by a DNA polymorphism. *Science* 258:806-808
- Grammas P, Botchlet TR, Moore P and PH Weigel (1997) Production of neurotoxin factors by brain endothelium in Alzheimer's disease. In: De la Torre JC and Hachinski V (1997) Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. Annals of the New York Academy of Sciences Vol. 826
- Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hal B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P and Xu H (1999) Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. *Neurobiology* 96;2:742-77
- Guetti B, Dlouhy SR, Giaccone G, Bugiani O, Frangione B and Farlow MR (1995) Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol.* 5:61-75
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G and Mena R (1998) Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 57:905-914
- Guiroy DC, Yanagihara R and Gajdusek DC (1991) Localisation of amyloidogenic protein and sulfated glycosaminoglycans in nontransmissible and transmissible cerebral amyloidoses. *Acta Neuropathol.* 82:87-92

- Hölscher C, Bach UT and Dobberstein B (2001) Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C-Terminus. *J. Biol. Chem.* 276: 13388-13394
- Horiiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N and Shinagawa M (1995) *J. Gen. Virol.* 76: 2583-2587
- Horwich (1993) Conversion of α -helices into β -sheets in formation of scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Sci. USA* 90:10962-10966
- Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J and Prusiner SB (1989) Linkage of a protein prion missense variant to Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Nature* 388:342-345
- Jin T, Gu Y, Zanusso G, Sy M, Kumar A, Cohen M, Gambetti P and Singh N (2000) The chaperone protein BIP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by proteasoma. *J. Biol. Chem.* 275:38699-38704.
- Kaneko K, Zullatello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE and SB Prusiner (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10069-10074
- Kitamoto T, Iizuka R and Tateishi J (1993) An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 192: 525-531
- Korh C, Kaneko K and SB Prusiner (2000) Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP^{sc} formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *J. Gen. Virol.* 81:2555-2563
- Liberski PP and Gajdusek DC (1997) Kuru: Forty Years Later, A Historical Note. *Brain Pathol.* 7:555-560
- Liemann S and Glockshuber R (1999) Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion disease on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry* 38:3258-3267
- Marth JD (1996) Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 6:701-705
- Masters CL and Richardson EP (1978) Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. *Brain* 101: 333-334
- Mcmanus J (1984) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23-99
- Meyer RK, McKinley RP, Bowman KA, Barry RA and Prusiner SB (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2310-2314
- Milhøvet O, Mangé A, Casanova D and Liemann S (2000) Effect of congo red on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells. *J. Neurochem.* 74:1:222-230

- Nerwa R and Harris DA (1999) Prion proteins carrying pathogenic mutations are resistant to phospholipase cleavage of their glycolipid anchors *Biochemistry* 38:8770-8777
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH and Aebersold R (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746
- Osborn HM and TH Khan (2000) Biological roles of oligosaccharides. En: Oligosaccharides. Their synthesis y biological roles. Oxford University Press.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M and Serban A (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10962-10966
- Piccardo P, Ghetti B, Dickson DW, Vinters HV, Giaccone G, Bugiani O, Tagliavini F, Young K, Doughy SR, Seiler C, Jones CK, Lazzarini A, Golbe LI, Quaglio E, Chiesa R and Harris DA. (2001) Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* 276; 14; 11432-11438
- Piccardo P, Ghetti B, Dickson DW, Vinters HV, Giaccone G, Bugiani O, Tagliavini F, Young K, Doughy SR, Seiler C, Jones CK, Lazzarini A, Golbe LG, Zimmerman TR, Perlman SL, McLachlan DC, Goege-Hyslop PH and Lennox A. (1995) Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (PRNP P102L): Amyloid deposits are best recognized by antibodies directed to epitopes in PrP region 90-165. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54:790-801
- Prieels J, Monnom D, Dolmans M, Beyer TA and Hill RL (1981) Copurification of the Lewis blood group N-acetylglucosaminide α 1-4-fucosyltransferase from human milk. *J. Biol. Chem.* 256:-:10456-10463
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216;9:136-144
- Prusiner SB (1995) El prion en la patología. *Investigación y Ciencia.* marzo:pp 14-21
- Prusiner SB (1998) Genetic and Infectious prion disease. *Arch. Neurol.* 50:1129-1153
- Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP and McKinley MP (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-1311
- Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB and Hood LE (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38:127-134
- Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA and Mock NI (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78. 6675-6679
- Quaglio E, Chiesa R and Harris DA (2001) Copper converts the cellular prion protein in to a protease-resistant species than is distinct from the scrapie isoform *J. Biol. Chem.* 276;14:11432-11438
- Rhodes MJ and JD Millon (1998) Lectin methods and protocols, Humana Press. Totowa, New Jersey USA

- Richardson EP and Masters CL (1995) The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in nervous system. *Brain Pathol.* 5:33-41
- Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Worldman MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A and Dwek RA (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13044-13049
- Rudd PM, Wormald MR, Wing DR, Prusiner SB and Dwek RA (2001) Prion glycoprotein: Structure, dynamics and roles for sugars. *Biochemistry* 40; 13: 3759-3766
- Salmona M, Forloni G, Diomedea L, Algeri M, De Gioia L, Angeretti N, Giaccone G, Tagliavini F and Bugiani O (1997) A neurotoxic and gliotrophic fragment of the prion protein increases plasma membrane microviscosity. *Neurobiology Dis.* 4:47-57
- Sánchez A, Guzmán A, Ortiz A, Rembao D, Espinosa B, Zeneno E and Guevara J (2001) Toluidine blue-O staining of prion protein deposits. *Histochem. Cell Biol.* 116:519-524
- Schachter H (1986) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol.* 64:163-181
- Schachter H (1995) Glycosyltransferases involved in the synthesis of N-glycan antenna. In: J Montreuil, H Schachter, JFG Vliegenthart (eds): *Glycoproteins*. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo.
- Schauer R (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj. J.* 17:485-499
- Schumacher U, Kretzschmar HA and Tateishi J (1991) Carbohydrate histochemistry of amyloid plaques in Gerstmann-Sträussler-Scheinker. *Eur. J. Basic Appl. Histochem.* 35;4:331-340
- Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang S-L, DeArmond SJ and Prusiner SB (1993) Propagation of prion with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73:979-988
- Stahl N and Prusiner SB (1991) Prions and prion proteins. *FASEB J.* 5;13:2799-807
- Stahl N, Baldwin MA, Burlingame A and Prusiner SB (1990) Identification of glycolipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 29; 38:8879-8884
- Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan KM, Burlingame AL and Prusiner SB (1992) Glycosylipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* 31;21:5043-5053
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K and Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51: 229-240
- Stein JH (1984) Trastornos neurológicos En: Medicina interna. La Habana Científico-Técnica 1-B

- Taraboulos A, Rogers M, Borchelt DR, McKinley MP, Scott M, Serban D and Prusiner SB (1990) Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8262-8266
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P and Montagna P (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274:2079-2082
- Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang S-L, Torchia M, Sidle KCL, Collinge J, DeArmond SJ and Prusiner SB. (1994) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9936-9940
- Vázquez-Navarrete MML, Massó F, Rosas Medina LP, Montaña LF, Zenteno E (1993) Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Com. Biochem. Physiol.* 105B:617-623
- Walmsley AR, Zeng F and Hooper NM (2001) Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein. *EMBO J.* 20:703-712
- Weissmann C (1999) Molecular genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *J. Biol. Chem.* 274:1:3-6
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, Von SC, López GF, Billeter M, Calzolari L, Widwe G and Wuthrich K (2000) NMR solution structure of human prion protein. *PNAS* 97: 145-150
- Zenteno (1998) Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry* 27;2:313-318
- Zhang H, Söckel J, Mehlhorn I, Groth D, Baldwin MA, Prusiner SB, James TL and Cohen FE (1997) Physical studies of conformational plasticity in a recombinant prion protein. *Biochemistry* 36: 3543-3553
- INEGI (2000) hombre y mujeres.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA