



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

NUEVA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE TINCIÓN AZUL DE
TOLUIDINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE
GERSTMANN-STRAÜSSLER-SCHEINKER: ANÁLISIS
COMPARATIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AURORA DEL CARMEN SÁNCHEZ GARCÍA

TUTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mis padres que me han formado, apoyado a lo largo de toda mi vida.

A mi hija Marian y mi esposo Enrique por ser parte de mi pequeña familia.

A mis hermanos Silvia, Sagrario, Graciela, Alejandro y Myriam por compartir gran parte de mi camino.

A la Especialista en Microscopia Electrónica Francisca Fernández Valverde por alentarme y escucharme cuando lo necesite.

A la Doctora Alma Ortiz Plata por los consejos tan acertados para elaborar esta tesis.

A la Maestra en Ciencias Aida Guzmán López por apoyar este trabajo.

A Dios por enseñarme que las cosas que cuestan más trabajo son muy valiosas.

Les doy las gracias.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Enfermedades causadas por priones o Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs)	2
Características del agente que causa las EETs	4
Similitudes y diferencias entre PrP ^{sc} y PrP ^c	12
Toxicidad de la PrP ^{sc}	13
Teorías del cambio conformacional de los priones	14
Glicosilación de la PrP ^c	20
Componentes de las placas prion	22
Tipos de EETs o Enfermedades por priones (EPRs)	24
Características Neuropatológicas de las EETs	25
Encefalopatías Espongiformes Transmisibles por priones en humanos	28
La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)	29
Nueva variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (nvECJ)	30
El Insomnio Familiar Fatal (IFF)	31
Enfermedad de Kuru	32
Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	33
Diagnóstico clínico de las EETs o EPRs	39
Objetivos	41
Hipótesis	42
Justificación	42
Material y método	42
Resultados	48
Discusión	59
Conclusión	63
Bibliografía	64

RESUMEN

Las enfermedades por priones o encefalopatías espongiformes transmisibles son un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales causadas por una forma anormal de proteína prion (PrP^{Sc}). La PrP^{Sc} es un glicoproteína de membrana de la cual no se conoce su función. Esta proteína se localiza anormalmente en depósitos intracelulares y en depósitos extracelulares, a estos últimos se les denomina placas prion. Para el diagnóstico de las enfermedades por priones se realizan estudios clínicos que no suelen ser concluyentes. Para establecer un diagnóstico definitivo se realizan estudios histopatológicos postmortem. Para el estudio postmortem se realiza la técnica de inmunohistoquímica para localizar depósitos de la PrP^{Sc} . Por lo tanto el objetivo de este trabajo es el de proponer a la técnica histoquímica de azul de toluidina para la detección de depósitos de PrP^{Sc} en muestras de encéfalo de enfermos con Gerstmann-Sträussler-Scheinker, ya que el azul de toluidina es un colorante utilizado para teñir mucinas y mucopolisacáridos, que son glicoproteínas. Para este estudio se contó con muestras de 15 regiones del encéfalo de un paciente con GSS y como control se tomaron muestras de igual forma de un paciente con enfermedad de Alzheimer. Nuestros resultados demostraron que el azul de toluidina permitió reconocer 69.1 \pm 2.6 % del total de placas prion reconocidas por el anticuerpo anti-prion. Además en las 15 regiones del encéfalo estudiadas para el paciente de GSS el azul de toluidina reveló los mismos arreglos reconocidos para el anticuerpo anti-prion. El azul de toluidina tiñó especialmente depósitos de proteína prion pero no placas β -amiloide de Alzheimer. Este método habrá la posibilidad de hacer un diagnóstico post-mortem. Los resultados además sugirieron que al no teñirse las placas de β -amiloide con el azul de toluidina indica que la proteína prion y la proteína β -amiloide, tienen una conformación espacial diferente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades causadas por Priones o Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

Las Enfermedades causadas por priones o prionopatías (EPRs), también conocidas como Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs). Estas enfermedades son neurodegenerativas, progresivas e invariablemente fatales y afectan tanto a seres humanos como a animales (Weissmann, 1999).

La primera descripción de una EETs se documenta en el siglo XVIII, y se refiere al rascado y temblor del carnero conocido como “scrapie”. Los médicos franceses Jean Cuillé y Paul Louis Chelle, en 1936 mostraron en la escuela veterinaria de Toulouse, que el scrapie era una enfermedad transmisible. Sin embargo, este hallazgo permaneció en el olvido por largo tiempo (Belay, 1999).

En la década de 1920, los primeros casos de una EETs en humanos fueron descritos por Hans-Gerhard Creutzfeldt y Alfons Maria Jakob. Los primeros casos de EETs señalaban a pacientes que cursaba con una extraña demencia presenil y que posteriormente recibió el nombre de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ). La ECJ, se clasificó como una enfermedad degenerativa del sistema nervioso (Belay, 1999).

En la década de 1950 el médico estadounidense Daniel Carleton Gajdusek estudiaba en Papua, Nueva Guinea, una enfermedad mortal del sistema nervioso en los nativos, a la cual denominaban Kuru (“escalofrío o risa”). El Kuru afectó de modo epidémico a la tribu de los Fore. Esta enfermedad era de

incidencia diferencial, y la presentaban las personas que consumían carne humana en ritos de canibalismo funerario. El rito incluía la ingestión del cuerpo de un familiar muerto. La gente de la tribu observó los síntomas del Kuru como: tembladera y risa incontrolada. Los individuos que presentaban estos síntomas morían. Ellos proponían que estos síntomas eran causados por hechizos, y por lo tanto, sólo afectaba al alma de los enfermos, pero no su cuerpo. Gajdusek sugirió entonces que el Kuru no correspondía a ningún esquema genético conocido (Prusiner, 1995).

El veterinario patólogo William J. Hadlow observó en 1959, las similitudes clínicas y neuropatológicas existentes entre el Kuru y el scrapie de las ovejas. Gajdusek puso de manifiesto posteriormente, que el Kuru tiene características comunes con la ECJ. A partir de estas comparaciones en la década de 1960 se hace referencia a: que las EETs son de evolución lenta e irreversible. Los síntomas de las EETs conducen a la muerte. Estas enfermedades causan lesiones muy características en el sistema como: la espongiosis. Estas enfermedades se pueden ser naturaleza infecciosa (Prusiner, 1995).

El equipo de Gajdusek en 1968 inoculó intracerebralmente a un grupo de chimpancés con tejido cerebral de pacientes muertos por Kuru. Así, este equipo comprobó que el Kuru era de carácter transmisible. Al ser descubierto el carácter infeccioso de las encefalopatías espongiformes, los investigadores iniciaron la búsqueda de un agente responsable (Belay, 1999).

2. CARACTERISTICAS DEL AGENTE QUE CAUSA LAS EETS

Las EETs provocaron gran desconcierto, por ser un grupo de enfermedades con comportamientos y distribuciones muy diferentes. Por ejemplo, el 90% de los casos de ECJ son esporádicos, el Kuru de naturaleza infecciosa y el síndrome de Gerstmann- Sträussler- Scheinker (GSS), tiene características de herencia clásica. En cuanto a la distribución, el Kuru es una enfermedad endémica de las aldeas de Nueva Guinea, mientras que el scrapie presenta una distribución mundial amplia. El desconcierto fue en aumento a medida que se presentaron datos de las propiedades particulares del agente infeccioso. Sobre todo, la resistencia insólita a diversos agentes desnaturizantes de ácidos nucleicos y de proteínas. Además, en el organismo hospedero no se observan los signos inflamatorios, ni respuesta inmunitaria, situaciones que se producen generalmente en las enfermedades infecciosas (Dormont, 2002).

La posibilidad de la existencia de un agente infeccioso carente de ácidos nucleicos capaz de causar y transmitir las EETs se propuso hacia 1969. El Dr. Stanley Prusiner descubrió y aisló las partículas proteicas infecciosas en 1982 y les asignó el nombre de prion (PrP), apócope de *proteinaceous infectious particle*, para designar a la partícula cuyo único componente conocido como agente etiológico es una proteína (Aranda, 1992).

Prusiner en 1983 observó que la PrP era una proteína del hospedero. Prusiner descubrió la existencia de dos isoformas de la proteína PrP, una de ellas causante de las EETs, denominadas proteína prion scrapie (PrP^{Sc}), y la forma normal se denominó proteína prion celular (PrP^C). La demostración de que ambas proteínas tienen una secuencia idéntica, pero diferente conformación

tridimensional, causó gran desconcierto entre la comunidad científica. Aunado a esto, se sugirió que la PrP^{Sc} es capaz de inducir el plegamiento de las PrP^C del organismo, adoptando la conformación anormal. Por lo tanto, la propuesta de Prusiner supone la existencia de dos plegamientos para la misma secuencia de aminoácidos. Estos dos tipos de plegamientos sugirieron que existe un flujo de información de una proteína a otra, a través de su estructura terciaria (Prusiner, 1995) (fig.1).

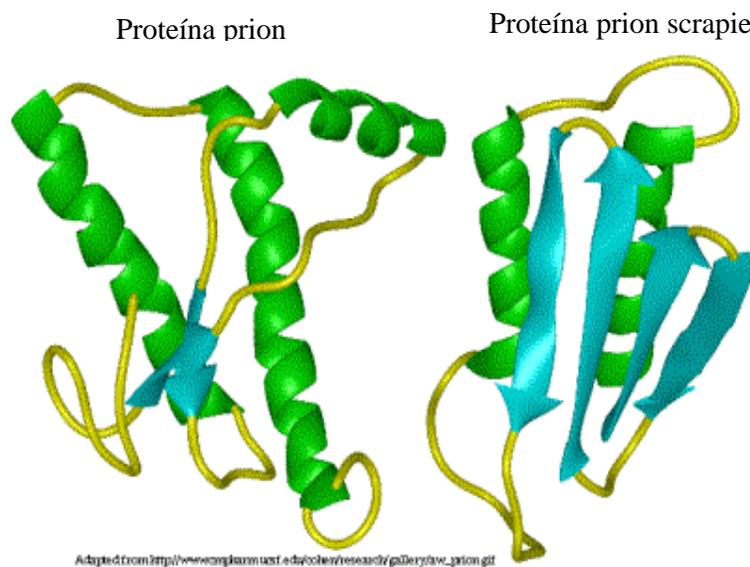


Figura 1. Esquema de la conformación tridimensional de la proteína prion celular (imagen izquierda) y de la proteína prion scrapie (imagen derecha), se puede detectar el cambio de cadenas de α -hélice en verde a cadena de β -plegamiento en azul.

Las EETs son causadas por la modificación postraduccional de la proteína prion celular PrP^C, que es una glicoproteína de superficie celular que se encuentra en las neuronas de forma natural, que mediante un cambio de conformación de la estructura terciaria resulta una isoforma patológica denominada PrP^{Sc}. La ausencia de respuesta inmune contra el prion y la presencia del gen que codifica para esta proteína en el genoma del hospedero,

confirmaron que el agente causal es una forma anormal de una proteína normal del organismo (Prusiner, 1995).

Este descubrimiento del cambio conformacional de la proteína prion contradice el Dogma Central de la Biología Molecular, ya que el agente etiológico es capaz de replicarse a sí mismo en ausencia de ácido nucleico. Además, existe la propuesta que la proteína prion atenta contra el principio biológico que establece que la secuencia de aminoácidos de una proteína determina de manera unívoca el plegamiento o estructura terciaria. Esta propuesta es debido a que en la actualidad se conoce la existencia de al menos dos isoformas de la proteína prion cuyas estructuras son termodinámicamente estables para mantenerse en condiciones fisiológicas (Liemann y Glockshuber, 1999). Además, con excepción de los casos hereditarios, no han sido encontradas diferencias químicas ni de estructura covalente entre ambas isoformas, lo que orienta el estudio del fenómeno al ámbito de la física (Zhang y cols., 1997; Kuwata y cols., 2002).

La identificación de la proteína permitió la localización y aislamiento del gen que la codifica, conocido como PRNP y localizado en el cromosoma 20 del humano. El conocimiento de la secuencia del gen PRNP permitió la identificación de las mutaciones presentes en los casos hereditarios y permitió a su vez, demostrar que los casos esporádicos, eran portadores de secuencias normales del gen PRNP (Prusiner, 1995).

La PrP^C es una glicoproteína de superficie celular constituida por 253 residuos de aminoácidos, con gran homología en los mamíferos. Su secuencia de aminoácidos 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).

La proteína prion celular PrP^C es sintetizada en los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) y es translocada de manera cotraduccional al interior de este organelo debido a la acción de una secuencia señal constituida por los primeros 22 aminoácidos del extremo amino terminal (N-terminal) de la proteína (Hölscher et.al., 2001). Una vez dentro del RE, el proceso postraduccional normal incluye la eliminación proteolítica de la secuencia señal (aminoácidos 1-22) y la eliminación de 22 aminoácidos de su extremo Carboxilo terminal (C-terminal). Posteriormente, le son adicionadas en el extremo C-terminal una o dos cadenas de oligosacáridos conocidas como glicosil-fosfatidilinositol (GPI), probablemente en la serina número 231 (Stahl et.al., 1990; Coria, 2002). El GPI se une covalentemente a los lípidos de la membrana plasmática de la célula funcionando como ancla, de manera que la proteína prion queda expuesta al medio extracelular. (Nandi et.al., 2002).

La mayoría de las moléculas de PrP^{Sc} contienen un GPI anclado a una Ser-231, resultado de la remoción de los 23 aminoácidos, pero el 15% esta trunca y termina en Gly-228. El análisis del ancla de GPI de la PrP^{Sc}, revela que existen 6 glicoformas, de las cuales dos contienen ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), carbohidrato que no se había reportado en ninguna otra ancla proteica de GPI. En el ancla de la PrP^C también se presentan glicoformas con ácido siálico, por lo que se argumenta que la presencia de este residuo sacarídico no distingue entre la PrP^C y la PrP^{Sc} (Prusiner., 1995).

Cerca del extremo N-terminal se encuentra una región que contiene 4 repeticiones del octapéptido PHGG(G/S)WGQ, rico en prolinas y glicinas (entre los residuos 60 y 93) y una secuencia homóloga que ha perdido un residuo de histidina PQGGGGWGQ (entre los residuos 52 y 60), posteriormente se encuentra una zona rica en aminoácidos hidrófobos. Existen dos sitios susceptibles de glicosilación (adición de carbohidratos) en las asparaginas 181 y 197. Además, los residuos 179 y 214 están unidos mediante un enlace disulfuro (Nandi et.al., 2002) (fig. 2).

Estudios realizados mediante Resonancia Magnética Nuclear muestran que la PrP^C posee un dominio globular que se extiende desde el aminoácido 125 hasta el 228. En este dominio se forman tres estructuras α -hélice en los residuos 144-154, 173-194 y 200-228, así como dos dominios de láminas β -plegada de los residuos 128-131 y 161-164. Existen tres zonas de irregularidad estructural, la primera es un asa constituida por los aminoácidos 167-171, la segunda comprende a los aminoácidos 187-194 y la tercera, a los residuos 219-228 (Zahn et.al., 1999) (fig.3).

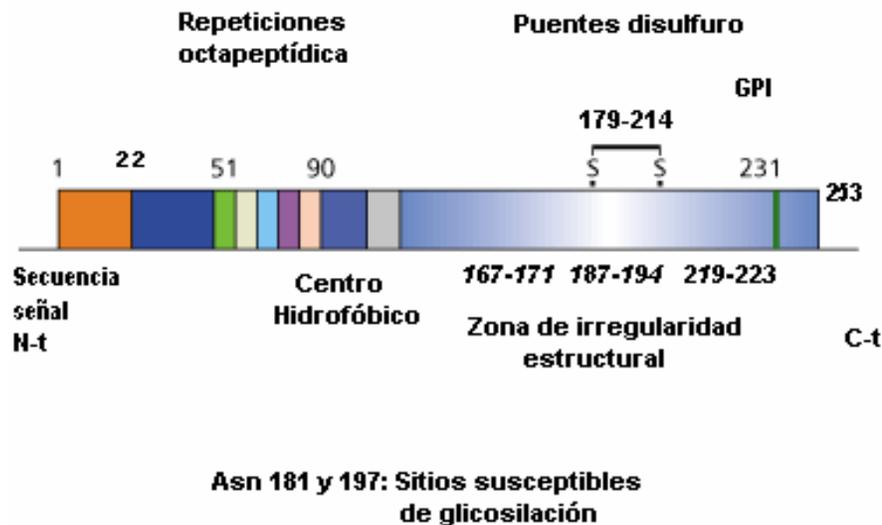


Fig. 2 Modelo lineal de la proteína prion celular (PrP^C)

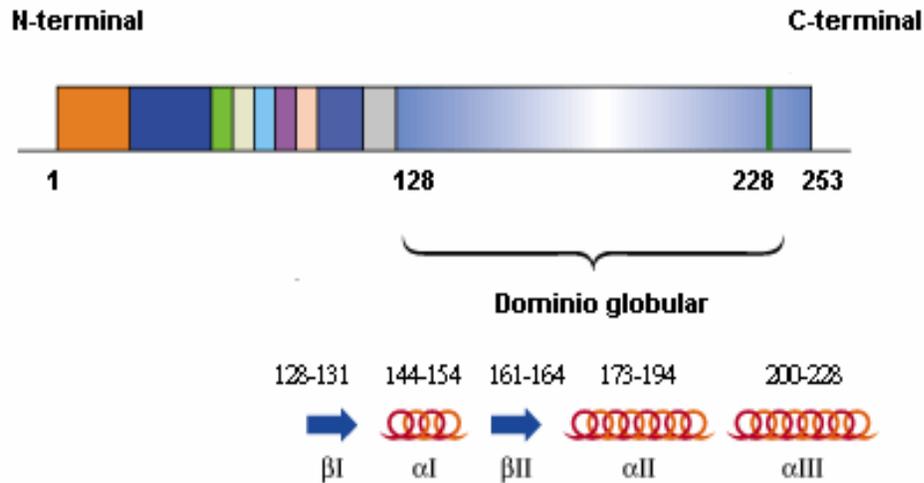


Fig.3 Modelo lineal de la proteína prion celular con el dominio globular.

La PrP se localiza en tejido nervioso, muscular y en células del sistema inmunitario (Horiuchi et.al., 1995). La mayor concentración de PrP^C ha sido reportada en las neuronas, particularmente en las membranas pre y post-sinápticas, lo que sugiere que posee importancia en el funcionamiento de éstas regiones neuronales (Brown, 2001).

Las funciones biológicas de PrP^C permanecen poco claras hasta ahora. Sin embargo, dado que su secuencia aminoacídica está especialmente conservada entre especies, se sugiere que posee especial importancia en procesos fisiológicos. Se ha reportado que PrP^C liga iones de cobre y que éste estimula la endocitosis de la PrP^C desde la superficie celular de manera rápida e irreversible (Quaglio et.al., 2001). Esto abre la posibilidad de que la PrP^C funcione como receptor celular de Cu⁺⁺ (Brown, 2001) (fig. 4).

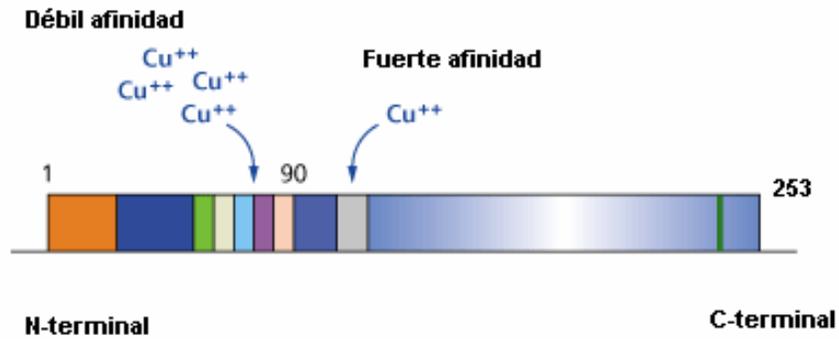


Fig. 4 Modelo lineal de la proteína priónica celular que muestra la afinidad por el ión cobre Cu⁺⁺.

Se ha propuesto también que PrP^C actúa como transductor de señales intracelulares para la protección neuronal, en este proceso de señalización están involucradas moléculas como el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y fosfoquinasas. Otros estudios sugieren que la proteína priónica está involucrada en el fenómeno de potenciación a largo plazo, en procesos fisiológicos del sueño y en mecanismos de adhesión célula-matriz extracelular (Martins y Brentani, 2002; Dormont, 2002; Cashmann y Caughey 2004).

No obstante su función específica de la PrP no ha sido dilucidada aún. Mediante un proceso hasta el momento desconocido, la PrP^C cambia su conformación espacial y se convierte en una forma anómala PrP^{Sc} que no cumple ninguna función en la célula y cuya presencia es causa de diferentes patologías (Brockes, 1999).

Los mecanismos de cómo interviene la PrP^{Sc} en las manifestaciones clínicas y neuropatológicas de las EETs son poco conocidos, únicamente existe evidencia de que la PrP^{Sc} ejerce efectos tóxicos sobre las neuronas que

pueden conducir las a la muerte mediante apoptosis. La presencia de una gran cantidad de vacuolas intraneuronales es debida a la división de la bicapa lipídica de las membranas neuronales, modificación probablemente relacionada con el hecho de que PrP^C es una proteína integral de dichas membranas (Coria, 2002). La acumulación de astrocitos reactivos y de células de la glía hipertróficas presentes en el tejido nervioso, probablemente sea consecuencia del daño neuronal (Prusiner, 1995).

2. 1. Similitudes y diferencias entre PrP^{Sc} y PrP^C

Las isoformas de la proteína prion (PrP^C y PrP^{Sc}) difieren notablemente en sus propiedades bioquímicas y metabólicas. Tanto la PrP^C como la PrP^{Sc} están codificadas en un cromosoma del huésped, sin que se hayan observado diferencias entre las uniones covalentes de ambas isoformas. Ambas tienen idéntico peso molecular de 33-35 KD. Tienen la misma secuencia de aminoácidos, y carbohidratos unidos de manera similar y GPI anclada. La PrP^{Sc} parece ser un derivado de la PrP^C que mediante un proceso postraduccional, impone un cambio conformacional profundo (ver fig. 1). A pesar de estas similitudes la PrP^{Sc} y la PrP^C pueden ser diferenciadas. La PrP^C se encuentra en la membrana plasmática de las células. La PrP^C es monomérica, sensible a la digestión con proteasas, soluble en presencia de detergentes y está compuesta de un 42% de estructuras α -hélice, y tan solo un 3% de laminas β -plegada. En contraparte, la PrP^{Sc} se encuentra en el citoplasma de las células infectadas, en depósitos en forma de placas, en el endotelio de los vasos sanguíneos y en leptomeninges. Es un amilode oligomérico insoluble, parcialmente resistente a proteasas, insoluble a detergentes y posee un 43%

de láminas β -plegada y 30% de α -hélice. Presenta además, resistencia a agentes desnaturalizantes de ácidos nucleicos y a desinfectantes comunes como el alcohol e hipoclorito de sodio (Stahl y Prusiner, 1990; Bell y col., 1993, DeArmond SJ y Prusiner SB, 1997).

2. 2. Toxicidad de la PrP^{Sc}

Se ha sugerido que la acumulación de las PrP^{Sc} en las vesículas lisosomales con lleva a una pérdida de espacio en el citoplasma de la neurona y con esto se promueve perdida de capacidades funcionales de la neurona, lo que la conduce a la muerte. Por otra parte, la acumulación de algunos metales parece importante en la fisiopatogénesis de las prionopatías. A este respecto, se ha observado que el Cu²⁺ estimula la endocitosis de la PrP^C desde la superficie celular, abriendo la posibilidad para que la PrP^C funcione como receptor celular de Cu²⁺. La conexión entre la PrP^{Sc} y el Cu²⁺ se basa en los porcentajes de Cu²⁺ que se encuentran en las sinapsis de células carentes de PrP^C. En estas células los niveles de Cu²⁺ son más altos de lo normal. Esto sugiere la importancia de la PrP^C en la protección de las células al daño oxidativo. La evidencia más importante, reportada por varios laboratorios, es la afinidad baja que presenta el Cu²⁺ por las repeticiones octapeptídicas en el extremo 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 (Brown y cols. 1994; Quaglio y cols., 2001).

En contraparte, otra teoría sugiere que la PrP^{Sc} presenta una asociación anormal con la membrana plasmática, lo que puede inducir a la muerte celular.

Se ha propuesto, que la toxicidad de la PrP^{Sc} se debe a las modificaciones que la PrP^{Sc} ejerce sobre las propiedades de la membrana plasmática de las neuronas y células gliales. En apoyo a esta teoría, se ha encontrado en forma particular, que el fragmento 106-126 de la PrP^{Sc} confiere la posibilidad de inserción en la membrana plasmática provocando disfunciones en la actividad de receptores o de los canales iónicos (Aguzzi y cols., 1997; Masters y Beyreuther, 1997).

2. 3. Teorías del cambio conformacional de los Priones.

Evidencias experimentales han probado que el evento fundamental y probablemente, causal, de las EETs es el cambio conformacional de la proteína prion celular PrP^C a la proteína prion anómala o “scrapie” PrP^{Sc} (DeBurman et.al., 1997) por lo que, en la actualidad, la mayoría de las investigaciones sobre la etiología de las EETs se han centrado en la elucidación de este fenómeno.

La conversión de PrP^C en PrP^{Sc} es un evento postraducciona que ocurre después de que la proteína “normal” PrP^C ha alcanzado su posición en el dominio extracelular de las membranas neuronales, o incluso, mucho después, durante el transporte vesicular de la proteína al interior de la neurona (Weissmann, 1999).

Debido a la existencia de distintos mecanismos de adquisición de las EETs, hereditario, esporádico e infeccioso, se han propuesto varias teorías que pretenden explicar el cambio conformacional, y se mencionan a continuación.

I. Desestabilización de la PrP^C debida a mutaciones del gen PRNP.

Las variantes hereditarias de las EETs se deben a mutaciones puntuales del gen PRNP que se manifiestan en la sustitución de un aminoácido por otro en la proteína prion (Cohen, 1999), o bien, en la inserción de repeticiones de aminoácidos en múltiplos de ocho (Belay, 1999). Prusiner sugiere que la presencia de aminoácidos incorrectos podría desestabilizar la estructura terciaria de la proteína, principalmente, en los dominios α -hélice, aumentando la posibilidad de que la hélice afectada y sus vecinas se plieguen nuevamente constituyendo estructuras en lámina β -plegada (Prusiner, 1995). En la actualidad, están caracterizadas alrededor de 30 mutaciones en familias con EETs heredadas (Weihl y Ross, 1998). Sin embargo, únicamente el 10% de los casos reportados de EETs son de origen hereditario, por lo que la vasta mayoría de las EETs son esporádicas e infecciosas y no presentan algún tipo de mutación en el gen, ni alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Prusiner, 1995). Por esta razón, esta teoría no está lo suficientemente argumentada como para explicar el cambio conformacional del 90% de los casos (Liemann y Glockshuber, 1999).

Para probar la validez de esta teoría en las EETs hereditarias, se ha estudiado la estabilidad termodinámica de ocho diferentes PrP^C cuya secuencia difiere únicamente en un aminoácido. Se ha probado que estas mutaciones puntuales están asociadas a EETs, pero se demostró que ninguno de los cambios aminoacídicos causa la inestabilidad suficiente para provocar el cambio de conformación característico de la PrP^{S^c}, por lo que se sugiere que la desestabilización de la PrP^C no es el mecanismo causal de la formación de la

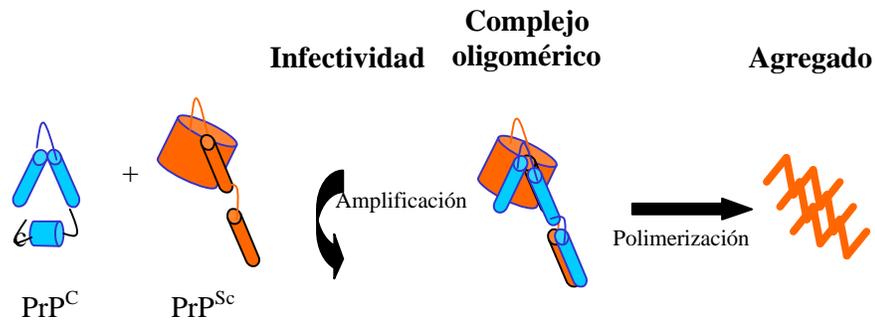
isoforma patológica en las variantes hereditarias (Liemann y Glockshuber, 1999).

II. Interacciones moleculares entre PrP^C y PrP^{Sc}.

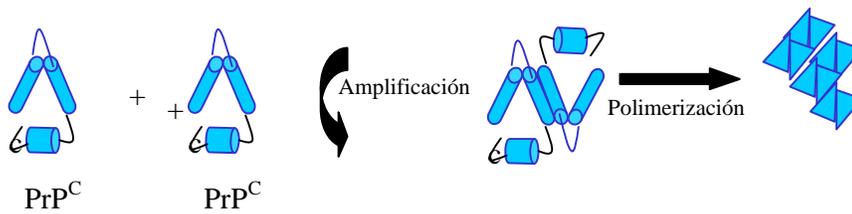
Esta teoría incluye dos modelos de explicación. El primero se denomina:

a) *Modelo de Nucleación*. Sugiere que la isoforma “normal” PrP^C se encuentra en equilibrio conformacional con la isoforma patológica PrP^{Sc} o con un precursor de ésta. Aunque la estructura de PrP^C es favorecida, el cambio conformacional es un proceso estocástico que ocurre cuando unas cuantas moléculas de conformación anormal actúan como una semilla o núcleo capaz de inducir el cambio masivo de moléculas normales en moléculas con la conformación anómala (Aranda, 1992; Fernández-Escamilla y col. 2004) y es el resultado de interacciones directas entre la PrP^C y de la PrP^{Sc} (Prusiner, 1982). Una vez que se inicia la transformación, ésta se propaga como una reacción en cadena, y debido a la insolubilidad que caracteriza a las moléculas de PrP^{Sc}, éstas se depositan en el citoplasma neuronal formando extensos agregados que dañan a las células (Aranda, 1992; Pan y cols. 1993; Cohen y cols., 1994). El proceso se asemeja al fenómeno de nucleación de los cristales, en el que una vez presente el cristal “semilla”, la agregación es ampliamente favorecida y ocurre de manera relativamente rápida (Weissmann, 1999). Estudios realizados por Come y Glover, en péptidos basados en secuencias de proteínas prion y en el factor de la levadura [PSI⁺] respectivamente, han demostrado que el mecanismo de conversión de los priones y la formación de agregados es dependiente del proceso de nucleación (Jarrett y Lansbury, 1993; Masters y Beyreuther, 1997; Castilla J. y cols. 2004) (Figura 5).

b) *Modelo de Plegamiento* propone que la conversión de la PrP^C requiere que ésta se encuentre desplegada y que se vuelva a plegar por segunda ocasión de manera anormal bajo la influencia de una molécula de PrP^{Sc} (Georgieva D. y cols. 2004). Este proceso requiere franquear una barrera energética muy grande (Gasset, 1996; Weissmann, 1999). La presencia de la PrP^{Sc} que iniciaría este proceso sería debida a la infección o a la transformación esporádica de moléculas PrP^C (Satheeshkumar K.S y cols. 2004). Este modelo ha sido apoyado al reportarse que en estudios *in vitro* la PrP^C, conformada mayoritariamente por estructuras α -hélice, es capaz de cambiar espontáneamente de conformación hacia estructuras β -plegada que constituyen la PrP^{Sc} (Kocisko et.al., 1994; Coria, 2002). (Fig. 5).



Modelo de plegamiento



Modelo de nucleación

Figura 5. Esquematización de los dos modelos de explicación de la teoría que supone que las interacciones moleculares entre PrP^C y PrP^{Sc} son la base del cambio conformacional de la proteína.

Como implicación inmediata de estos dos modelos de explicación del cambio conformacional, se propone que es necesaria la presencia de la PrP^C en el hospedero para que pueda ser establecida una infección; esto fue corroborado por

Prusiner en 1982, al demostrar la resistencia de ratones transgénicos sin el gen PRNP, y que por lo tanto, no producían proteína prion PrP^{Sc} al ser infectados por scrapie (Prusiner, 1995).

III. Procesos postraduccionales.

Debido a que no se han encontrado diferencias químicas entre la PrP^c y la PrP^{sc}, se presume la existencia de otros procesos implicados en el cambio conformacional y en la agregación de la PrP. Estos procesos permiten explicar la patología de las prionopatías a través de las modificaciones postraduccionales de la PrP. Un proceso similar se estudia ya en la Enfermedad de Alzheimer (EA) donde se ha observado la importancia que tienen los procesos postraduccionales de las proteínas involucradas que se agregan y se vuelven insolubles, la proteína tau y β -amiloide. (Guevara J. y cols. 1998; Espinosa B. y cols. 2003). Al parecer, tanto en la EA y en las enfermedades por priones existen mecanismos comunes en la agregación e insolubilidad de las proteínas. Una proteína no es biológicamente activa hasta que adquiere la conformación plagada nativa, determinada por su secuencia de aminoácidos. La cadena polipeptídica adopta espontáneamente, durante o después de su síntesis, su conformación. De este modo, el mensaje genético lineal que es portado en el ARN mensajero, se convierte en una estructura tridimensional específica un nuevo polipéptido sintetizado. Sin embargo, en muchos casos es necesario que la cadena polipeptídica recién sintetizada experimente una modificación postraduccional. Finalmente, la proteína adopta su conformación nativa respectiva. A estos cambios, se les denomina modificaciones postraduccionales y dependen de la naturaleza de la proteína. Uno de los mecanismos postraduccionales de mayor importancia en la fisiopatogénesis de las EETs, es la glicosilación. (Guevara J. y cols. 1998; Espinosa B. y cols. 2003).

2.4 Glicosilación de la PrP^c

La glicosilación consiste en la adición covalente de oligosacáridos a las proteínas y lípidos de manera enzimática, y donde los carbohidratos quedan como cadenas laterales. Las proteínas glicosiladas o glicoproteínas tienen funciones importantes en membranas, lisosomas y en el espacio extracelular, participando principalmente como moléculas de reconocimiento celular. En contraste, pocas proteínas del citosol se encuentran glicosiladas.

Las glicoproteínas contienen una o más cadenas de carbohidratos, que están clasificadas de acuerdo con el aminoácido al que se une el azúcar; tipo N-glicosídico si se enlaza sobre una asparagina (Asp), y del tipo O-glicosídico cuando la transferencia se realiza con serina (Ser) o treonina (Thr).

La PrP^c posee dos sitios propicios para cadena de N-oligosacáridos (en los residuos 180 y 196) y en el C-terminal (residuos 179). Los sitios son ocupados en forma variable, conformando cuatro glicofomas de la proteína, mismas que coexisten. Una está doblemente glicosilada, dos monoglicosiladas y una no glicosilada (Clausen y Benneth, 1996). Los oligosacáridos que están unidos a la PrP^c, son N-oligosacáridos, establecen formas octagonales, con carga negativa. Éstos cubren a la proteína impidiendo, por efecto esférico, las interacciones intramoleculares o intermoleculares. El hecho que la PrP contenga tal variedad de complejos oligosacáridos, sugiere que se modifican las propiedades que distinguen entre la PrP^c y PrP^{sc}. Sin embargo, células tratadas con un inhibidor de la glicosilación, como la tunicamicina, produjeron

especies simples de la PrP no glicosiladas, pero resistentes a proteasas. En este experimento se concluyó que la N-glicosilación no es esencial para la síntesis de la PrP resistente a proteasas. Sin embargo, no hay evidencia de que las moléculas de PrP^{sc} no glicosiladas se asocien a la infectividad en las enfermedades por priones. Por otra parte, los modelos propuestos de la PrP^c, indican sitios probables de unión para la proteína X. Esto indica que la presencia de las cadenas de carbohidratos no constituye un impedimento para la asociación entre la PrP^c y la proteína X teórica propuesta. Aunque en estos modelos aparece un número importante de sitios posibles para la O-glicosilación, no se han detectado O-glicanos en la PrP^c de hámster. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado la existencia de residuos O-Glicosilados en los depósitos de PrP^{sc} en el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). Hasta el momento se ha sugerido que las modificaciones postraduccionales que pudieran dar lugar al cambio conformacional de PrP^c a PrP^{sc} son producto de la N-glicosilación. (Rudd y cols. 1999; Chen y cols. 2002). La O-glicosilación no ha sido tomada en cuenta para explicar la transformación de la PrP, ya que en las fracciones aisladas, tanto de PrP^c como de PrP^{sc}, no se han encontrado este tipo de cadenas de carbohidratos. Por la dificultad para purificar fracciones de ambas isoformas de la PrP, y por la degradación, es factible suponer que los carbohidratos O-glicosilados pudieran estar presentes en la proteína prion y que no hayan sido detectados. Chen y cols., evaluaron los efectos que puede tener la adición de carbohidratos O-glicosilados al fragmento 108-144 de la proteína prion. Observaron que la adición de α -GalNAc en la serina 135 evita la formación de agregados fibrilares, no así el carbohidrato β -GlcNAc que incluso potencia la

agregación fibrilar del péptido, al igual que el α -GalNAc pero en la serina 132 (Chen y cols. 2002).

2.5 Componentes de las placas prion

Los estudios de la formación de los depósitos en forma de placas de la PrP^{Sc} se encuentran restringidos por el hecho de que los casos de EETs muestran estados avanzados de evolución de la enfermedad, y en la mayoría de ellos los depósitos de PrP^{Sc} ya están presentes. Condición diferente en la Enfermedad de Alzheimer, otra demencia que presenta depósitos amiloides, donde la evolución de la formación de los depósitos se puede estudiar en fases tempranas en individuos sanos, ya que de manera común con la edad se comienzan a formar los depósitos de la proteína β -amiloide (Prusiner, 1995). La morfología de los depósitos de la PrP^C y del β -amiloide es muy similar, por lo que se ha sugerido que ambos tienen un patrón de formación similar. Miyazono y colaboradores en 1991, observaron, tanto que en los depósitos de la PrP^{Sc}, como en los del β -amiloide se presenta una asociación específica con células astrocíticas y microgliales, ambas reactivas (Brown y cols., 1993).

En el síndrome de GSS se observa un patrón de asociación; como son los astrocitos que se encuentran en la zona circundante a los depósitos de PrP^{Sc} y proyectan prolongaciones hacia el depósito. Este tipo de asociación se encuentra en depósitos de reciente formación, lo que sugiere la participación de los astrocitos en las primeras etapas de formación de las placas de PrP^{Sc}. (Prusiner, 1995).

Las células de la microglía se encuentran inmersas de manera abundante dentro de placas compactas en estado avanzado de agregación, Se desconoce el papel que desempeñan los astrocitos y la microglía en la patogénesis de las enfermedades causadas por priones. Sin embargo, por las características de interacción que se conocen entre estos tipos de células, y la producción de sustancias que se liberan en condiciones de daño, es posible que desempeñen un papel importante en el deterioro del SNC observado en las EETs. (Miyazono y cols., 1991).

Se ha observado que la PrP^{sc} comienza a acumularse dentro de los astrocitos, antes de que se observen otros cambios neuropatológicos, lo que sugiere que los astrocitos están implicados en el proceso de replicación de la PrP^{sc} (Diedrich y cols., 1991). También se ha observado que el péptido PrP 106-126, basado en la secuencia humana, provoca la proliferación de astrocitos. Sin embargo, para observar dicha proliferación in vitro, no solo se requiere que los astrocitos expresen PrP^c, también se necesita la presencia de las células de la microglía y de su activación (Forlioni y cols., 1994; Brown, 2001).

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) sobre todo de la clase de proteoglicanos heparan sulfatados (HSPG), en las placas prion de los cerebros de humanos y animales. (Snow AD, 1990).

3. TIPOS DE EETs O ENFERMEDADES POR PRIONES (EETs)

Según su origen, los casos de enfermedades por priones pueden agruparse en tres clases: esporádicos, hereditarios e infecciosos. Las EETs constituyen un

grupo de enfermedades neurodegenerativas en el humano como son: la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvECJ), el insomnio fatal familiar (IFF), el Kuru, la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), todas causadas por priones. En los animales, los priones provocan las encefalopatías espongiiformes del ganado bovino (EEB), mejor conocida como “enfermedad de las vacas locas”, las encefalopatías del ganado ovino, caprino, de ungulados como el venado y el alce, así como de felinos silvestres y domésticos. La enfermedad primeramente descrita fue el “scrapie” o prurito lumbar en ovejas y cabras (Prusiner, 1995; Belay, 1999). Los animales afectados pierden la coordinación motora hasta el punto en que les es imposible ponerse de pie, se tornan irritables y en algunos casos, sufren de un prurito intenso. Los síntomas por lo general se intensifican progresivamente y culminan con la muerte del animal en el transcurso de un año (Prusiner, 1995).

En los bovinos la enfermedad que más publicidad ha recibido en la Gran Bretaña y en el mundo, es la EEB, por lo que en Europa y en los países con epidemia del ganado vacuno, especialmente en Inglaterra y Francia, se ha descrito una variante atípica de la ECJ (nvECJ) en pacientes jóvenes de entre 16 y 41 años. Con la epidemia de EEB en el Reino Unido, muchas personas se preocuparon por la posibilidad de contraer la nueva variante de enfermedad nvECJ, por el consumo de carne contaminada. Actualmente, no existe evidencia de que el hombre sea susceptible de infectarse con el agente infeccioso de EEB. Sin embargo, sí hay casos demostrados de infección en otros animales (como cerdos y gatos) que han desarrollado encefalopatías

espongiformes después de haber consumido carne infectada. El argumento que originó la polémica, fue el descubrimiento de lesiones similares en un macaco infectado por EEB y en víctimas de nvECJ. Sin embargo, la barrera de especie hace poco probable la transmisión entre bovinos y humanos. La PrP^{sc} de la EEB se ha encontrado en dos productos habitualmente consumidos por el hombre: el músculo esquelético y la leche (sobre los linfocitos) de vaca. Aunque no se ha podido demostrar la posibilidad de transferencia de encefalopatías espongiformes de vacas a personas, tampoco hay evidencias que garanticen lo contrario. Ya que se ha pensado que existe una relación entre consumo de carne, como consecuencia de la epidemia en el ganado vacuno, y el desarrollo de la nvECJ (Prusiner, 1995).

3. 1 Características Neuropatológicas de las EETs

Las EETs incluyen procesos degenerativos y muerte de las neuronas en ausencia de una respuesta inflamatoria e inmune. Cuando se observan muestras de cerebros con ayuda del microscopio de luz se describen los siguientes aspectos importantes de cambios neuropatológicos que son: espongiosis, degeneración neuronal, astrocitosis y en algunos casos la presencia de cúmulos de la PrP^{sc} conocidos como placas prion (Hadlow, 1999).

La espongiosis es el signo característico de la enfermedad y se refiere a alteraciones en el neurópilo, cuyo rasgo esencial se deben a dilataciones focales o hinchamiento de procesos neuronales principalmente dendritas, estas varían de dimensiones como parches de pequeños hoyos a porosidades difusas en la sustancia gris (Hadlow, 1999).

La degeneración neuronal es la afectación de los cuerpos neuronales, los cuales se observan de color oscuro, con encogimiento y con una apariencia angular denominado atrofia, esclerosis celular o enfermedad crónica celular. Un signo de la degeneración que lleva a la pérdida neuronal es la presencia de vacuolas intracitoplásmicas dentro de las neuronas (Hadlow, 1999).

Aún se desconoce la relación que existe entre la presencia de PrP^{sc} y la degeneración 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 degeneración de las neuronas se debe a la pérdida de la función de la PrP^c (Prusiner y cols., 1982; 1984; 1995).

La astrocitosis es la hipertrofia e hiperplasia de astrocitos en la sustancia gris, esto puede ser el signo más llamativo cuando se examinan muestras de pacientes con enfermedades por priones en comparación con los dos procesos anteriores. Sin embargo la astrocitosis puede parecer una respuesta primaria, que ocurre en estados tempranos en la evolución de las lesiones

neurodegenerativas, y suele considerarse simplemente como un reacción, pero diversos reportes proponen que puede auxiliar en el diagnóstico cuando los cambios espongiformes y degeneración neuronal no son obvios (Hadlow, 1999). Pero se ha observado que las regiones de astrogliosis coinciden con la distribución de la acumulación de la PrP^{Sc} (DeArmond y cols., 1985).

Las placas prion 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 EETs; son raras en la ECJ y abundantes en el Kuru y en el síndrome de GSS (Balanzat, 1998) (fig. 6).

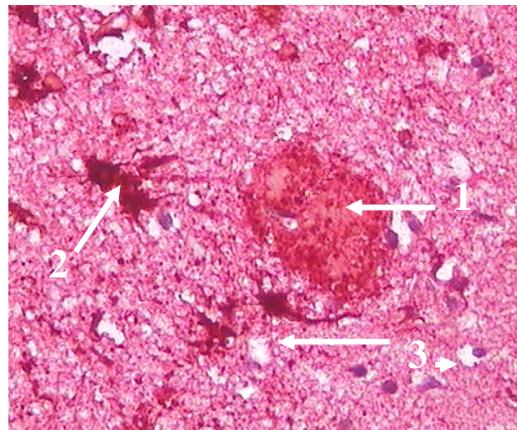


Figura 6. Depósitos de la proteína prion en la corteza cerebral de un individuo con enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, se observa **(1)** Depósitos de la proteína Prion anómala. **(2)** Astrocitos hipertróficos **(3)** Cambio espongiforme. Inmunohistoquímica contra el segmento 27-30KDa de la proteína Prion y la Proteína Ácida Glial Fibrilar (20x).

4. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles por Priones en Humanos

En los humanos, las Enfermedades causadas por priones presentan un cuadro patológico que incluye ataxia, temblor generalizado, pérdida de coordinación, disturbios de memoria, disfunción motora, pérdida de las habilidades cognitivas, demencia progresiva e invariablemente, la muerte (Belay, 1999). En

este tipo de padecimientos se encuentran la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvECJ), el Insomnio Familiar Fatal (IFF), el Kuru y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS).(Belay, 1999; Weissmann, 1999)(Tabla 1) .

Tabla 1.Características de las enfermedades causadas por priones que afectan al ser humano

EPR	Etiología	Características clínicas	Características neuropatológicas	Inicio y tiempo de duración
ECJ	La forma esporádica se presenta en un 85-90% de los casos. Es hereditaria en un 10-15% de los casos. Infecciosa en un porcentaje ínfimo.	En un tercio de los casos se presentan síntomas iniciales como fatiga, ansiedad, depresión, pérdida de peso, cefalalgia, y pérdida de capacidades cognitivas. Los síntomas prácticamente constantes incluyen anormalidades conductuales, mioclonías y demencia.	Cambio esponjiforme, pérdida neuronal, astrogliosis y depósitos de proteína prion en forma de placas unicéntricas. La corteza cerebral es la región más afectada en esta enfermedad	Inicio: 50-65 años. Duración: 8-36 meses
nvECJ	Infecciosa, posiblemente relacionada con la ingestión de tejido corporal de ganado con EEB.	Trastornos conductuales como agitación, agresión, ansiedad, apatía, depresión y labilidad emocional. Ataxia, movimientos involuntarios, incontinencia urinaria, demencia tardía.	Cambio esponjiforme, astrogliosis y pérdida neuronal mayoritariamente en los ganglios basales y el tálamo. Grandes depósitos de proteína prion. Afección predominante del cerebelo.	Inicio: 16 a 41 años. Duración:14 meses
IFF	Es hereditaria, por una mutación puntual en el codón 178 del gen que codifica para la proteína prion. Se han reportado casos esporádicos.	Trastornos progresivos del sueño que culminan con insomnio, disfunción del sistema nervioso autónomo, trastornos del sistema endocrino y muscular, pérdida de la independencia funcional.	Usualmente, ausencia de cambio esponjiforme, pérdida neuronal, astrogliosis. Usualmente, ausencia de placas de proteína prion. Se afecta al tálamo principalmente	Inicio: 35-61 años Duración :13 meses
KURU	Infecciosa, debida a la práctica del canibalismo.	Cefalalgia, dolor articular, pérdida de coordinación, trastornos del movimiento, labilidad emocional seguida de demencia. Esta enfermedad está caracterizada por ataxia cerebelosa progresiva	Cambio esponjiforme, astrogliosis, pérdida neuronal vacuolización neuronal, grandes depósitos de proteína prion.	Inicio: Variable Duración: 1 año.
GSS	Es hereditaria en el 100% de los casos; ocasionada por mutaciones puntuales de carácter autosómico y dominante en el gen que codifica para la proteína prion.	Ataxia progresiva, parálisis ligeras, parálisis espasmódicas agitantes, mioclonías y demencia.	Las mismas que en el caso de la ECJ, sin embargo, las placas de proteína prion son multicéntricas y difusas. La GSS afecta a todo el cerebro.	Inicio: 45 años. Duración: 5 años

4.1 La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)

ECJ fue descrita por primera vez en 1920 por H.G. Creutzfeldt y A. Jakob, y fue la primera EETs reportada en los humanos. En la mayoría de los casos, la enfermedad se presenta en un 85-90% de forma esporádica; únicamente es hereditaria en un 10 a 15% de los afectados. Existen reportes indicando que hay infecciones de ECJ transmitidas por transplantes de córnea, implantes de duramadre, empleo de electrodos cerebrales e instrumentos quirúrgicos contaminados, así como por inyección de hormonas del crecimiento obtenidas de glándulas hipofisarias humanas (Prusiner, 1995; Belay, 1999). En un tercio de los casos se presentan síntomas iniciales como fatiga, ansiedad, depresión, pérdida de peso, cefalalgia y deterioro rápido de capacidades cognoscitivas. Los síntomas prácticamente constantes incluyen anormalidades conductuales, mioclonías y demencia severa. Sus características neuropatológicas son: cambio espongiiforme, pérdida neuronal, astrogliosis leve a moderada en la corteza cerebral y depósitos de proteína prion en forma de placas unicéntricas. La corteza cerebral es la región más afectada en esta enfermedad. El rango de inicio es de entre los 50 a los 65 años de edad y su duración promedio es de 8 meses. La incidencia anual de la ECJ, que es la EETs más frecuente, es de uno a dos casos por millón de personas (Weihl y Ross, 1998; Coria, 2002; Arango JC, 2003).

4.2 Nueva variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (nvECJ)

En 1996 se estudiaron 10 casos de una nueva prionopatía, expertos de la Secretaría de Salud del gobierno de Gran Bretaña informaron que el agente etiológico de la encefalopatía espongiiforme bovina ("enfermedad de las vacas

locas”) se había extendido a los humanos. El surgimiento de una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob probablemente esté relacionado con la ingestión de tejido nervioso, muscular o de médula ósea de ganado infectado. Algunos trabajos experimentales han evidenciado la relación entre el agente causal de la EEB y la nvECJ; la transmisión exitosa de la EEB a primates no humanos, la equivalencia de características bioquímicas particulares del agente causal en ambas enfermedades y la estrecha similitud de sus perfiles neuropatológicos. Sin embargo, la comunidad científica carece de estudios epidemiológicos que demuestren el significado de dicha relación (Aguzzi y cols., 1997; Wehl y Roos, 1998). Las características clínicas son trastornos conductuales como: agitación, agresión, ansiedad, apatía, depresión, labilidad emocional, ataxia, movimientos involuntarios, incontinencia urinaria, demencia tardía de la nvECJ que difieren de la ECJ clásica debido a que incluyen la edad de inicio más temprana, duración más prolongada. Las características neuropatológicas son cambio esponjiforme, astrogliosis y pérdida neuronal mayoritariamente en los ganglios basales y el tálamo. Grandes depósitos de proteína prion. Afección predominante del cerebelo. El rango de presentación del nvECJ es entre los 16 a 41 años de edad. Su duración promedio es de 14 meses. (Wehl y Roos, 1998; Coria, 2002; Arango JC, 2003).

4.3 El Insomnio Familiar Fatal (IFF)

Es una enfermedad caracterizada por trastornos progresivos del sueño, trastornos del sistema endocrino y del sistema muscular. Esta enfermedad culmina con la declinación cognoscitiva, pérdida de la independencia funcional y la muerte (Coria, 2002). La enfermedad fue reportada desde 1939 pero se

describió por primera vez en 1986 en un individuo de 53 años de edad que se presentó con insomnio progresivo (Belay, 1999; Wehl y Roos, 1998). E. Lugarest, R. Medori y P. Gambeti en 1992 acuñaron el nombre del padecimiento refiriéndose al síntoma más característico que es el insomnio, y fue reconocido como demencia por priones debido a sus características neuropatológicas como: ausencia de cambio esponjiforme, pérdida neuronal, astrogliosis, usualmente ausencia de placas prion, se afecta el tálamo principalmente. Todos los casos reportados hasta entonces son hereditarios con un patrón autosómico dominante. El IFF se asocia a la sustitución del ácido aspártico por asparagina como resultado de la mutación puntual en el codón 178. (Arango JC, 2003).

El rango de presentación del IFF es entre los 35 y 61 años de edad. Su duración promedio es de 13 meses, pero su rango fluctúa entre 7 y 25 años. Sin embargo, recientemente ha sido identificada una EETs de carácter esporádico con características clínicas y neuropatológicas muy similares a las del IFF, aunque aún no se ha corroborado que se trate de la misma enfermedad (Wehl y Roos, 1998; Coria, 2002; Arango JC, 2003).

4. 4 Enfermedad de Kuru

Fue descrito por Vicent Zigas y Carleton Gajdusek en 1957. Consiste en una EETs endémica de los miembros de la tribu Fore de las islas de Papúa, Nueva Guinea. Estudios epidemiológicos sugieren que el Kuru era transmitido mediante la ingestión de los cadáveres de familiares en un ritual religioso, afectando mayoritariamente a mujeres y niños de ambos sexos que consumían preferentemente el tejido cerebral (Liberski y Gajdusek, 1997; Wehl y Roos, 1998). El cese del canibalismo en la década de 1950 propició la desaparición

casi total de la enfermedad, hecho que evidencia el papel del endocanibalismo en la transmisibilidad del Kuru. Los individuos afectados sufrían de cefalalgia y dolor articular, síntomas que precedían a la disfunción cerebelosa caracterizada por dificultad para caminar, pérdida de la coordinación motriz, labilidad emocional seguida de demencia y temblores generalizados. La muerte ocurre en el transcurso de uno a dos años después de la presentación de los síntomas. Las características neuropatológicas son cambio esponjiforme, astrogliosis y pérdida neuronal vacuolización neuronal, grandes depósitos de proteína prion. El rango de presentación es muy variable. Su duración promedio es de 1 año. (Hainfellner et.al., 1997; Wehl y Roos, 1998; Arango JC, 2003).

4.5 Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

Es una enfermedad con herencia autosómica dominante fue descrita por primera vez en 1936 por los neurólogos Gerstmann y Sträussler y el neuropatólogo Scheinker de ahí la denominación de enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). Desde que el nombre de GSS fue usado para describir un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas con origen familiar, movimientos mioclónicos, diagnóstico electroencefalograma (EEG), y características neuropatológicas típicas de las EETs y numerosas placas prion. GSS es considerada una variante de la familia de CJD, pero es primeramente asociada con mutaciones al codón 102 y menos frecuentemente con mutaciones al codón 105, 117, 145. 198 o 217 del gen de la proteína prion. Esto puede ocurrir en una incidencia anual de 5 casos/ 100 millones. Los signos neurológicos y síntomas que son comúnmente reportadas

en pacientes con GSS incluyen ataxia cerebelar, movimientos anormales, demencia, disartia ocular y hiporflexia de bajas extremidades. Sin embargo las diferentes mutaciones del gen de la proteína prion son asociadas con presentación clínica variable, edad de presentación y duración del mal (Belay, 1999).

El diagnóstico de GSS se presenta como una mezcla de disturbios cognitivos y motores, y un extenso depósito de placas multicentricas amiloides. La GSS no es tan simple como la CJD. Hay seis desordenes hereditarios cuyos nombres les han sido designados por su presentación clínica, patológica y unión a diferentes mutaciones de gen de la proteína prion. La mutación del codón 102 a sido relacionada con la familia original descrita por GSS sin embargo el desorden neurodegenerativo con otras 5 patogenias por mutación del gen de la proteína prion a sido también designada GSS sobretodo por que estas presentan placas multicentricas de proteína prion del tipo GSS. Para el diagnóstico diferencial de todos estos desordenes debe incluir Corea de Huntington, degeneración espino cerebelar, enfermedad de Alzheimer familiar y esclerosis múltiple (Dearmond y Prusiner, 1997).

4. 5. 1 GSS ATAXICA (P102L)

Presentación clínica

La GSS atáxica es muy parecida a la primera GGS descrita en 1936. Seitelberger definió a esta como una ataxia espinocerebelar con demencia y depósitos parecidos a placas. La mutación 102 ha sido encontrada en alrededor de 32 familias en Austria, el Reino Unido, Canadá, USA, Francia,

Alemania, Italia, Israel y Japón. Las manifestaciones clínicas varían dentro del mismo linaje familiar. Las características clínicas incluyen dificultad en el caminado y temblores y algunas veces dolor de piernas y parestesia en estados tempranos y más tardíamente estados de deterioro mental y de comportamiento. El examen neurológico revela ataxia cerebelar, disartia, dismetría ocular, hiporeflexia y signo de Babinski. Características de amiotropía con fasciculación muscular y fibrilaciones han sido reportadas. Tres de los siete casos de GSS han sido transmitidos a primates no humanos (Belay, 1999).

Características Neuropatológicas

El sello distintivo patológico de la ataxia GSS son las placas prion multicéntricas, que son más numerosas en la capa molecular de la corteza del cerebelo. Éstas con frecuencia consisten de una masa central grande, rodeadas por pequeños depósitos satélite. Adicionalmente, la capa molecular del cerebelo en algunos casos contiene numerosas placas amorfas o primitivas que tienen 150- 200 μm de diámetro. Éstas no cumplen con el criterio para placas maduras desde que son débilmente positivas para PAS y raramente presentan verde birefringente con la tinción rojo congo. Las placas de tipo Kuru unicéntricas pueden estar también presentes. Las placas GSS, placas Kuru y placas primitivas especialmente inmunohistoquímica con anticuerpo anti-PrP, la reacción puede ser aumentada en la técnica HCL-autoclave. La degeneración de la materia blanca se asemeja a otros sistemas degenerativos, como la ataxia de Friedreich's, es una característica de la mayoría de los casos. La pérdida neuronal es dispersada por todo el cerebro y médula espinal. La

degeneración espongiiforme es variable en grado y extensión y puede ser difícil detectarlo (Belay, 1999).

4. 5. 2 GSS TELENCEFALICO (A117V)

Presentación clínica

Originalmente la enfermedad de presencia familiar fue diagnosticada como CJD, pero fue más tarde reclasificada como GSS a causa del número y localización de las placas por inmunopositividad de PrP. La mutación A117V fue descrita por primera vez en una familia francesa y después en una familia americana de descendencia alemana. La principal característica clínica incluye demencia progresiva usualmente asociada con disartria, rigidez, temblor y hiper-reflexia. Facie enmascarada en algunos individuos más temblor y rigidez sugiere parkinsonismo. Ataxia y mioclonus es raro (Belay, 1999).

Características Neuropatológicas

La principal característica neuropatológica es la presencia de cuatro tipos de placas prion. En el primer tipo son placas multicentricas que se componen de 4 a más de 10 masas amiloides. El segundo tipos son grupos de placas prion de un diámetro entre 150 a 500 μm . Estos grupos de placas están localizados en la neocorteza, hipocampo, núcleo caudado y putamen. Algunos grupos también están presentes en la materia blanca subcortical. Segundo hay placas prion del tipo Kuru: Estas tienen un diámetro entre 20 a 70 μm y están localizadas principalmente en la materia blanca. El tercer tipo de placas prion son unicentricas de 50 a 150 μm sin radiaciones espiculares en su periferia se ensamblan centros de placas seniles del tipo Alzheimer., sin embargo, no

tienen un alo de neuritas distroficas. Estas son encontradas en la corteza, hipocampo, núcleo caudado y el putamen. El cuarto grupo son placas amorfas o primitivas que tienen un diámetro de 150 a 200 μm , esta son similares a las presentes en algunos casos de GSS-ataxico; estas están localizadas en las capas de la corteza cerebral profunda. Todas las placas son específicamente inmunolocalizadas con anticuerpos para proteína prion pero no con anticuerpos βA4 . La degeneración esponjiforme no esta presente en las áreas corticales o subcorticales. La astrositosis esta asociada primariamente con placas amiloides en la neurocorteza. El núcleo caudado, putamen, globo pálido y el tálamo presentan pérdida neuronal severa con astrositosis. Hay una perdida neuronal moderada en la sustancia nigra. Nochiln y colaboradores encontraron placas prion u otros cambios neuropatológicos en el cerebelo, sin embargo, otros han reportado placas cerebelosas inmunopositivas con la proteína prion (Belay, 1999).

4. 5. 3 GSS (F198S) CON MARAÑAS NEUROFIBRILARES

Presentación clínica

Las características clínicas de este desorden familiar de PRP son la ataxia, parkinsonismo y demencia. Los individuos que presentan esta mutación son normales y alrededor de las edades de 30 a 60 años pueden presentar los síntomas. La presentación de los síntomas es una perdida gradual de la memoria a corto plazo de desmayos que pueden ser exagerados cuando el individuo esta bajo stress o cansancio. Los síntomas pueden progresar rápidamente en un periodo de un año o lentamente alrededor de 5 años. Rigidez y bradiquinesia ocurre generalmente después de la enfermedad en el

que tiempo de la demencia también empeora. Hay una pequeña o no tremor. La rigidez y la bradiquinesia mejoran con análogos L-dopa. El paciente sin tratamiento de parkinsonismo muere en un año, y con tratamiento, puede sobrevivir de 2- 3 años. En imágenes con resonancia magnética se observa acumulación de hierro en el globo pálido en la sustancia nigra, esto se desarrollan simultáneamente con el parkinsonismo. Se observa una prominente atrofia cerebelosa (Belay, 1999).

Características Neuropatológicas

Ghetti y col. Describieron las características neuropatológicas de este desorden prion único. Aunque las formas de neuropatología de los GSS se centran en placas prion, una población con GSS (F1198S) es verdaderamente remarcable porque esta sugiere un solapamiento con la patogénesis de la Alzheimer, con otras formas de GSS, un gran número de placas multicéntricas tipo GSS y placas unicéntricas son localizadas en la corteza cerebral y cerebelosa. En adición, hay placas neuríticas típicas con centros amiloides en muchas áreas de la corteza cerebelar y el hipocampo las placas son del tipo de la Alzheimer. Las neuritas distróficas están rodeadas de un centro amiloide que se inmunolocaliza con anticuerpos anti-tau como la enfermedad de Alzheimer, sin embargo, los centros amiloides de placas neuríticas y no neuríticas se inmunolocalizan con anticuerpos anti- PrP pero no con anticuerpos del péptido β A4 de la Alzheimer, en paciente graves la inmunoreactividad con β A4 puede ser encontrado en la periferia de los depósitos de placas de proteína prion.

Otra similitud con la enfermedad de Alzheimer es la presencia de marañas neurofibrilares en algunas de las regiones corticales particularmente en el giro

parahipocampal. La pérdida neuronal ocurre en casi todas las regiones de la corteza cerebelar pero es más severa en la corteza cerebelar donde hay una marcada pérdida de células de Purkinje. La pérdida neuronal es prominente en una variedad de núcleos incluyendo la sustancia nigra, núcleo rojo, la oliva inferior y el núcleo dentado. La degeneración espongiiforme es mínima y focal cuando llega a ocurrir (Belay, 1999).

5. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LAS EETS O EPRS

El primer diagnóstico de las EETs se realiza por métodos clínicos y el diagnóstico definitivo se establece con el estudio neuropatológico del tejido cerebral obtenido por autopsia y por los métodos moleculares en casos hereditarios. Un cuadro subagudo, con afectación neurológica multisistémica, demencia global y evolución rápida son datos clínicos que sugieren una EETs. El electroencefalograma es un elemento importante en el diagnóstico positivo, sobre todo cuando aparecen los complejos periódicos de ondas agudas trifásicas en registros seriados, donde se puede en estas condiciones alcanzar una sensibilidad del 67% y una especificidad de 84%, si se hacen los registros a lo largo de la evolución de los pacientes. Sin embargo, los complejos periódicos aparecen en las fases tardías de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y no en otras EETs. En las fases iniciales aparecen de forma característica la actividad delta aplanada rítmica e intermitente de localización frontal. Las técnicas de neuroimagen, sobre todo la resonancia magnética nuclear T2 y densidad protónica, demuestran la presencia de un aumento simétrico de la señal en el caudado y putamen en las fases tempranas (80% de

los casos), pero en fases posteriores se aprecia una atrofia cortical progresiva rápida (Belay, 1999).

Clínicamente se establece un diagnóstico de probabilidad, apoyándose en técnicas de laboratorio. Sin embargo, es necesario el diagnóstico definitivo mediante el estudio histopatológico, para comprobar la presencia de la PrP^{Sc}. Las técnicas de tinción histológicas utilizadas incluyen principalmente a la hematoxilina-eosina (H-E), así como técnicas especiales de histoquímica como la técnica del ácido periódico de schiff (PAS). La técnica de inmunohistoquímica nos permite confirmar el diagnóstico categóricamente, demostrando la presencia de la PrP^{Sc} como depósitos en el neuropilo o bien dentro de las neuronas. (Belay, 1999; Sánchez y cols., 2001).

El patrón histopatológico que de acuerdo a los diferentes reportes se ha descrito es la espongiosis (degeneración espongiiforme). Esta se caracteriza por la topografía de predominio cortical de las vacuolas en las capas 4-5. Se observa espongiosis acentuada con vacuolas grandes en las capas 2 y 3. Sin embargo, la espongiosis se extiende a todo el grosor cortical, observado en el Creutzfeldt-Jakob. Las placas Kuru se refieren a las no-neuríticas, visibles con hematoxilina-eosina y positivas al rojo congo. Los depósitos de PrP^{Sc} presentes reaccionan con los anticuerpos anti-PrP, pero son negativas al rojo congo. Sin embargo, estas varían considerablemente de caso a caso, pudiendo encontrar casos con lesiones abundantes, hasta casos sin ningún dato de encefalopatía espongiiforme. Ante estas dificultades de diagnóstico histopatológico, es importante hacer uso de otras técnicas de apoyo de acuerdo a diferentes posibilidades (Sánchez y cols., 2001).

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de la técnica de tinción de azul de toluidina para el diagnóstico de la enfermedad *Gerstmann-Sträussler –Scheinker* (GSS).

6.1 Objetivos Particulares

- Realizar diferentes técnicas de tinción como hematoxilina y eosina, azul de toluidina, Bielschowsky e Inmunohistoquímica para localizar placas de PrP^{Sc} en el tejido nervioso central de un caso de autopsia de un paciente con la enfermedad de GSS.
- Observar si la técnica de Bielschowsky que es utilizada para localizar placas neuríticas característica de la enfermedad de Alzheimer, se identifican placas de PrP^{Sc}.
- Cuantificación de las placas PrP^{Sc} en 15 regiones encefálicas de un paciente con GSS, utilizando diferentes técnicas histoquímicas.

7. HIPÓTESIS

La técnica de histoquímica azul de toluidina se utiliza para la identificación de glicoproteínas, entonces con la aplicación de esta técnica podemos valorar su utilidad para el diagnóstico post-mortem en tejido cerebral de GSS, que es una enfermedad debida al depósito anormal de la PrP^{Sc} que es una glicoproteína.

8. JUSTIFICACIÓN

La técnica de inmunohistoquímica para localizar PrP^{sc} es la más utilizada para el diagnóstico de las EPRs, pero para algunos laboratorios es difícil tener acceso a ella debido a los recursos con los que cuentan. Por este motivo, se pretende utilizar otra técnica histoquímica que ayude a un diagnóstico histopatológico de manera sencilla y eficiente.

9. MATERIAL Y METODO

Material biológico.

Se obtuvo el encéfalo de un paciente masculino de 53 años de edad y con síndrome demencial de 5 años de evolución, con diagnósticos molecular e histopatológico de enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (mutación PNRP P102L). Tomando en cuenta el protocolo de autopsia y estudio histopatológico para enfermedades demenciales se tomarán muestras de 15 áreas del encéfalo, siendo las siguientes:

- 1) La corteza frontal superior anterior.
- 2) La corteza frontal posterior.
- 3) La corteza parietal.
- 4) La corteza calcarina.
- 5) Hipocampo y giro occipitotemporal.
- 6) Ganglio basal (núcleo caudado, putamen y accumbens).
- 7) Ganglio basal (globus pallidus, putamen y la sustancia innominada).
- 8) La amígdala con el uncus.
- 9) El tálamo núcleo lateral dorsal.
- 10) El tálamo núcleo lateral ventral.
- 11) Protuberancia porción dorsal.
- 12) Protuberancia porción ventral.
- 13) Bulbo raquídeo y médula espinal.
- 14) Cerebelo.
- 15) Corteza temporal.

Además se obtuvieron muestras de un paciente sano y uno con Enfermedad de Alzheimer, los cuales fueron utilizados como control. Cada muestra obtenida se fijó en formol al 10%, por un periodo de 2 semanas, transcurrido este tiempo las muestras fueron lavadas en agua, se deshidrataron con alcoholes

graduales comenzando con alcohol al 70%, 80%, 96% y 100%. Se aclararon en Xilol y se infiltraron en parafina, en cada solución permanecieron 1 hora. Este proceso se llevó a cabo en un procesador automático de tejidos. Posteriormente las muestras fueron incluidas en parafina líquida para obtener bloques y ser cortados, realizándose cortes de 5 µm de espesor y se realizó: la técnica de hematoxilina-eosina, la técnica de impregnación argéntica de Bielschowsky, la técnica histoquímica de azul de toluidina y la técnica de inmunohistoquímica para detectar PrP^{Sc}.

Técnica de hematoxilina y eosina

Los cortes fueron desparafinados en xilol, xilol-alcohol absoluto, e hidratados en alcoholes graduales en orden decreciente 100%, 96% y 80% hasta llegar a agua destilada, haciendo un cambio de 2 minutos cada uno. Posteriormente fueron tratados durante 8 minutos en ácido fórmico, se enjuagaron en agua destilada, y se colocaron durante 2 minutos en hematoxilina de Gill, se lavaron en agua destilada, se diferenciaron con una solución saturada de carbonato de litio hasta que las secciones tomaron un color azul y se lavaron en agua destilada. A continuación se contrastaron con una solución de eosina por 1 minuto, se deshidrataron con etanol al 96% y etanol absoluto, y se aclararon con xileno, para ambos procedimientos se realizaron 2 cambios de 2 minutos cada uno y se montaron con resina sintética, para su observación.

Técnica de impregnación argéntica de Bielschowsky

Los cortes fueron desparafinados xilol, xilol-alcohol absoluto, e hidratados en alcoholes graduales en orden decreciente 100%, 96% y 80% hasta llegar a

agua destilada, haciendo un cambio de 2 minutos cada uno. Posteriormente fueron tratados durante 8 minutos en ácido fórmico, se enjuagaron en agua destilada, se continuó colocando los cortes en 50 ml de Nitrato de plata al 20% previamente calentada a 38°C por 15 minutos, se les retiró la solución de nitrato de plata y se enjuagaron con agua destilada. A la solución de nitrato de plata se le añadió hidróxido de amonio, a esta solución se le denomina plata amoniaca. Los cortes se colocaron en la plata amoniaca a 38°C por 15 minutos a continuación se pusieron en una solución de hidróxido de amonio al 1% por 3 minutos. A la plata amoniaca se le añadieron de 10 a 25 gotas de la solución reveladora hasta que los cortes tomaron un color café claro y las prolongaciones nerviosas se tornaron negras. Para detener la reacción de la plata se colocaron las laminillas en una solución de hidróxido de amonio al 1% por 3 minutos. Para evitar que la plata se precipitara los cortes se colocaron en una solución de tiosulfato de sodio al 5% por 5 minutos. Se lavaron tres veces en agua destilada y por último se deshidrataron con etanol al 96%, más etanol absoluto en dos cambios de 2 minutos cada uno. Después se aclararon con xileno, realizando los mismos cambios y tiempos, para posteriormente montarse con resina sintética.

Técnica de azul de toluidina

Los cortes fueron desparafinados xilol, xilol-alcohol absoluto, e hidratados en alcoholes graduales en orden decreciente 100%, 96% y 80% hasta llegar a agua destilada, haciendo un cambio de 2 minutos cada uno. Posteriormente fueron tratados durante 8 minutos en ácido fórmico, se enjuagaron en agua destilada, y se trataron con una solución de ácido acético y alcohol etílico

absoluto en una relación de 1:3 durante 10 minutos, se lavaron abundantemente en agua destilada, se tiñeron con solución de azul de toluidina al 1% a la cual se le agregó 1 gr. de borato de sodio, en esta solución se mantuvieron de 5 a 10 minutos. A continuación se lavaron en agua destilada, se deshidrataron con etanol al 96% y etanol absoluto. Posteriormente, se aclararon con xileno. Para la deshidratación y aclaración, se realizaron 2 cambios de 2 minutos cada uno y se montaron con resina sintética, para su observación.

Técnica de inmunohistoquímica anti-prion

Los cortes fueron desparafinados xilol, xilol-álcohol absoluto, e hidratados en alcoholes graduales en orden decreciente 100%, 96% y 80% hasta llegar a agua destilada, haciendo un cambio de 2 minutos cada uno. Posteriormente fueron tratados durante 8 minutos en ácido fórmico, se enjuagaron en agua destilada, y se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 2.6% para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, se lavaron en amortiguador de fosfatos con pH 7.4. Se realizó recuperación antigénica sumergiendo las laminillas en una solución amortiguadora de citratos al 0.1 Molar con pH 6.0, a baño María en un horno de microondas por 3.5 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se enjuagaron en PBS (solución buffer de fosfatos). Se colocaron los cortes en una solución de albúmina sérica bovina libre de IgGs al 2% diluido en PBS durante 20 minutos, para posteriormente lavarse de nuevo en PBS. Los cortes fueron colocados en una solución de tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 10 minutos y después de varios lavados se les adicionaron 150 μ l del anticuerpo primario

anti-prion policlonal de cabra, dilución 1:100 en PBS, dejándose en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas, fueron lavados en PBS y se colocó el segundo anticuerpo anti-cabra conjugada con la vitamina biotina de conejo, dilución 1:100 en PBS pH 7.4 durante 90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se usó el complejo enzimático streptavidina conjugada con la enzima peroxidasa dilución 1:60 en PBS en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos y se enjuaga en PBS. Para revelar la unión entre la biotina conjugada al anticuerpo secundario y la streptavidina conjugada con la enzima peroxidasa, se le adicionó el cromógeno DAB (diaminobencidina) al 0.03% en agua destilada, se esperó un minuto y se agregaron 400 μ l de H₂O₂ por cada 5ml de solución, se les adicionó esta solución a los cortes lentamente hasta que se observó el cambio de color del tejido, a café y se lavaron con agua corriente. Se contrastaron las laminillas con hematoxilina de Gill durante 15 segundos, se enjuagaron con agua corriente, por último se deshidrataron con etanol al 96% y etanol absoluto y se aclararon con xileno, para la deshidratación y aclaramiento se realizaron 2 cambios de 2 minutos cada uno y se montaron con resina sintética, para su observación.

Cuantificación de depósitos de priones en GSS

Las 15 regiones del encéfalo fueron revisadas con un objetivo de 20 X. La densidad de placas fue obtenida mediante el análisis de los tres campos histológicos más representativos con presencia de placas prion utilizando las técnicas de azul de toluidina e inmunohistoquímica para detectar PrP^{sc}. El

número total de lesiones positivas identificadas fue reportado como placas por mm^2 +/- de error estándar.

10. RESULTADOS

10. 1 Observaciones con el microscopio de luz

Hematoxilina- Eosina para GSS.

El estudio microscópico con la técnica de H-E se observó vacuolización esponjiforme difusa con predominio en la corteza parietal e hipocampal, degeneración y muerte neuronal intensa (fig.7). Se identificaron estructuras de forma esférica difusas, con una región central eosinófila, denominada placa prion. Dichas estructuras se encuentran dispersas por en el parénquima cerebral y abundantes en el cerebelo (fig.8). En el cerebelo se observó pérdida importante de neuronas en la capa de Purkinje y en la capa granulosa. Además se detectaron depósitos intracitoplasmáticos eosinófilos en algunos cuerpos neuronales con degeneración (fig.9).

Impregnación argéntica de Bielschowsky en tejido GSS

Para la técnica argéntica de Bielschowsky se observó que las neuronas y sus prolongaciones se impregnaron de plata y en menor intensidad el neurópilo, no fueron evidentes las placas de proteína prion y los depósitos intraneuronales (fig.10).

Azul de toluidina en tejido GSS

Con la técnica de azul de toluidina se observó vacuolización del parénquima cerebral, se identificaron estructuras esféricas con proyecciones dispuestas en forma radiada y con variaciones en la intensidad del color, desde azul claro hasta un color azul intenso (fig. 11), algunas placas prion se presentan como agregados de placas pequeñas y grandes, principalmente en el cerebelo (fig. 12). A estas estructuras se identificaron como placas prion. Los cuerpos neuronales mostraron una tonalidad de color azul fuerte y el parénquima cerebral de color muy tenue. Con esta tinción se pudo distinguir el núcleo, depósitos intracitoplasmáticos de color azul (fig. 13).

Inmunohistoquímica anti-prion en tejido GSS

Con la técnica de inmunohistoquímica para localizar PrP^{sc}, el parénquima cerebral presento vacuolización y esta técnica fue útil ya que se observaron depósitos de la PrP^{sc} conocidas como placas prion de diferentes tamaños muy evidentes (fig. 14). Además, se detectaron grupos de tres a cinco placas en el cerebelo y el hipocampo (fig. 15). También hubo positividad en la pared de vasos sanguíneos y en las leptomeninges. Las neuronas presentaron depósitos intracelulares marcados fuertemente en neuronas de la corteza cerebral, lo que indica que están formados por la PrP^{sc} (fig. 16).

Azul de toluidina en enfermedad de Alzheimer

Con la técnica de azul de toluidina las muestras del paciente con enfermedad de Alzheimer se observó que este colorante no se une a las placas neuríticas que son estructuras características de estas enfermedad, solo tiñó el parénquima cerebral. Los cuerpos de las neuronas y el núcleo de las células gliales se tiñeron positivamente (fig. 17).

Técnica de Bielschowsky en enfermedad de Alzheimer

Con la técnica de Bielschowsky se observó que las placas neuríticas son evidentes, hay pocas neuronas, algunas presentan marañas neurofibrilares, los axones son de color negro (fig. 18).

Observaciones en tejido cerebral normal

En el tejido cerebral humano normal observado con las diferentes técnicas no se evidenciaron estructuras parecidas a placas prion o depósitos intraneuronales.

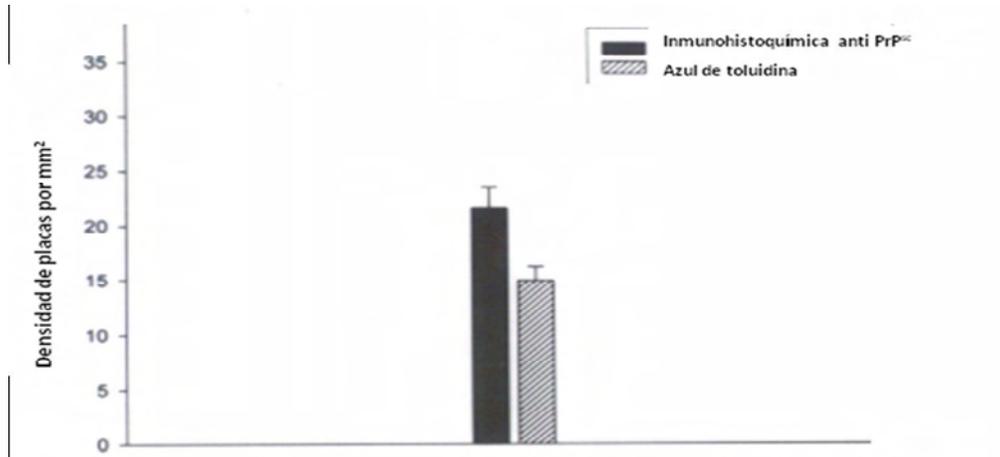
10. 2 Cuantificación de depósitos de priones en GSS

Después de la revisión y cuantificación de las diferentes regiones del encéfalo, se obtuvo la densidad media de placas prion por mm^2 , con la tinción de azul de toluidina de placas positivas de secciones subsecuentes fue de 15 ± 1.3 placas por mm^2 . Las regiones 5 y 14 del encéfalo presentan una gran densidad de placas teñidas (40 ± 7.6 y 37.7 ± 1.8 placas por mm^2

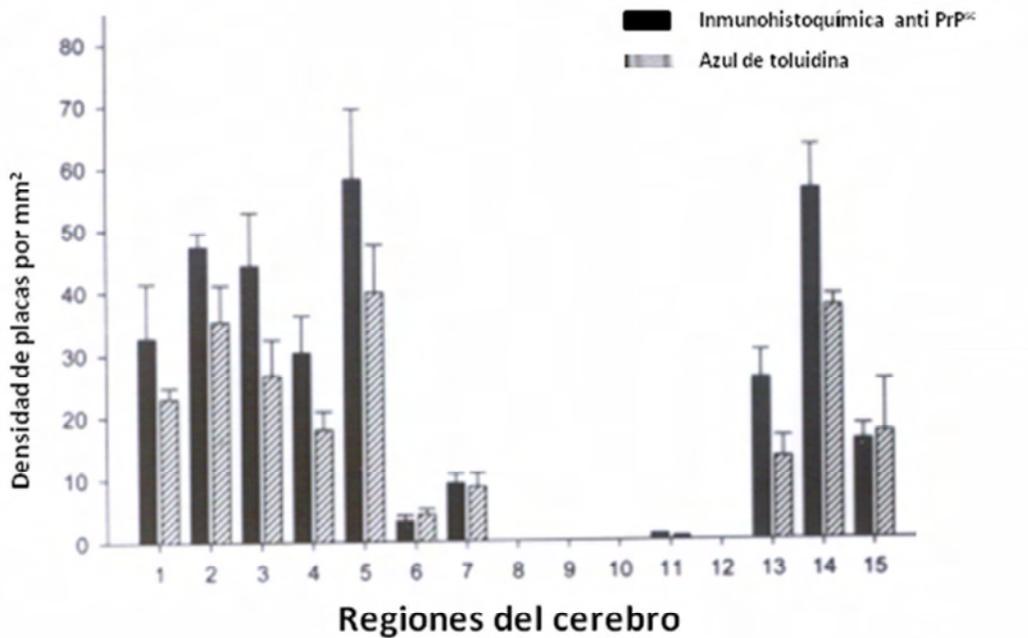
respectivamente), donde en las regiones 8, 9, 10 y 12 no hubo la presencia de placas prion.

La densidad media de las placas cuantificadas con la técnica de inmunohistoquímica para detectar PrP^{sc} fue de 21.7 +/-1.9 placas por mm², se localizaron estas placas en 12 áreas de 15. Las áreas que mostraron más densidad de placas fueron 5 y 14 (58.3 +/- 11.3 y 56.7 +/- 7.1 respectivamente), las áreas 8, 10 y 12 no presentaron placas.

Esta evaluación indica que el azul de toluidina reconoció el 69.1% +/- 2.6% del marcaje de placas en comparación con el número de placas que se identificaron en la técnica inmunohistoquímica para anti-prion. El azul de toluidina reconoció las placas de las mismas regiones que fueron reconocidas por la técnica del anticuerpo anti-prion. La técnica de azul de toluidina evidenció depósitos intracelulares en las neuronas al igual que la técnica de inmunohistoquímica anti-prion. La técnica de azul de toluidina morfológicamente identifica placas que son reconocidas con el anticuerpo en GSS (gráficas 1 y 2).



Gráfica 1. Media de la densidad de placas prion por mm² teñidas con azul de toluidina y la técnica de inmunohistoquímica para detectar PrP^{sc} de las 15 regiones del encéfalo revisadas.



Gráfica 2. Densidad de placas de proteína prion distribuidos por cada área analizadas

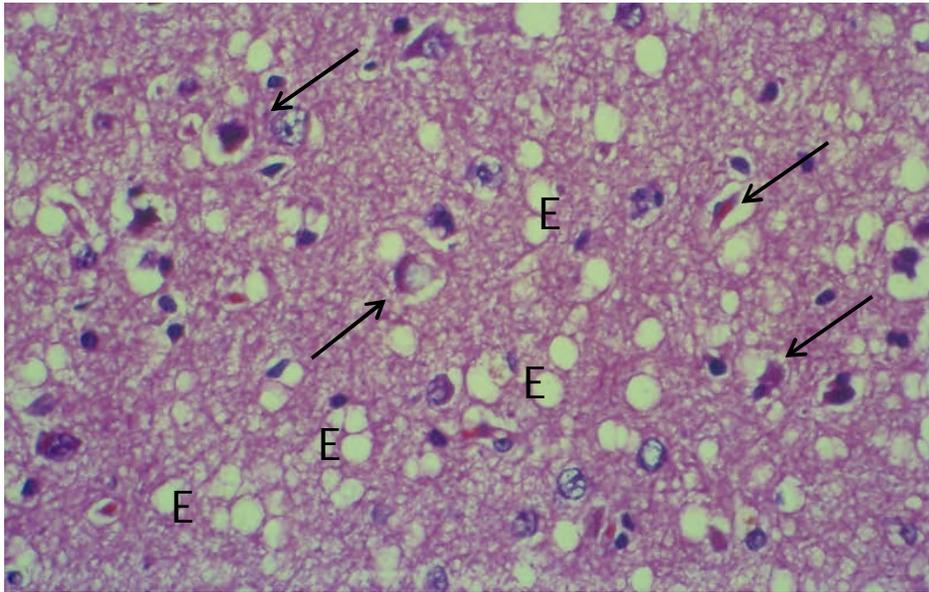


Fig. 7 Imagen de un corte de un paciente con GSS se observa el proceso de espongiosis (E) y degeneración neuronal (flechas). Tinción hematoxilina y eosina. 10x.

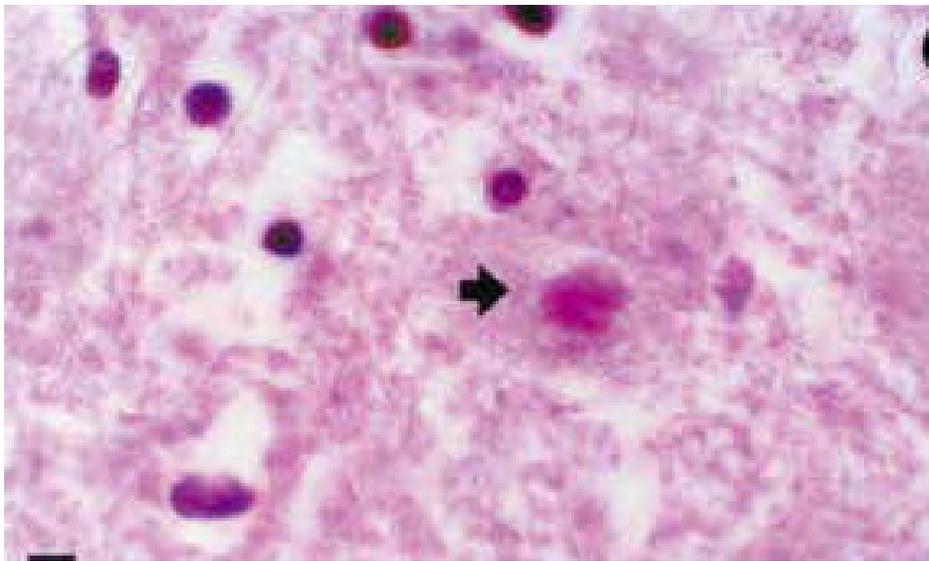


Fig. 8 Imagen de una placa prion teñida con hematoxilina y eosina, se observa el depósito eosinófilo (flecha). 40x.

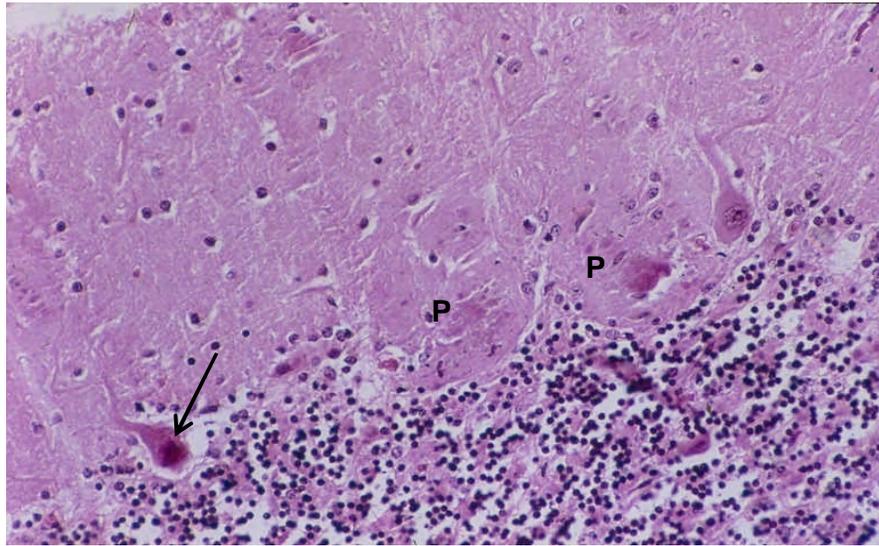


Fig. 9 Placas prion en cerebello (P), se observan células de Purkinje una con depósitos eosinófilos intracelulares (flecha). Tinción de hematoxilina y eosina 40x.

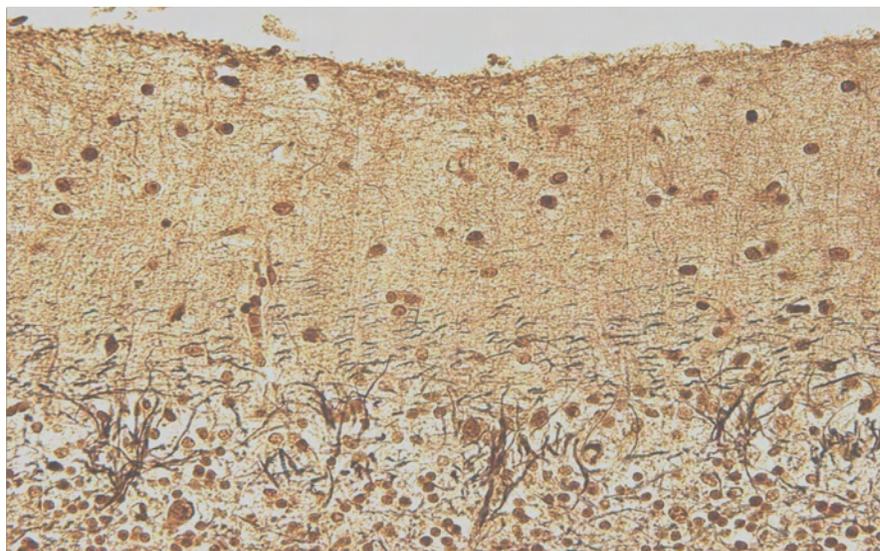


Fig. 10 Corte de un paciente con GSS teñido con la técnica de Bielschowsky no se observan Placas prion, no hay presencia de células de Purkinje y los axones se observan de color negro .10x.

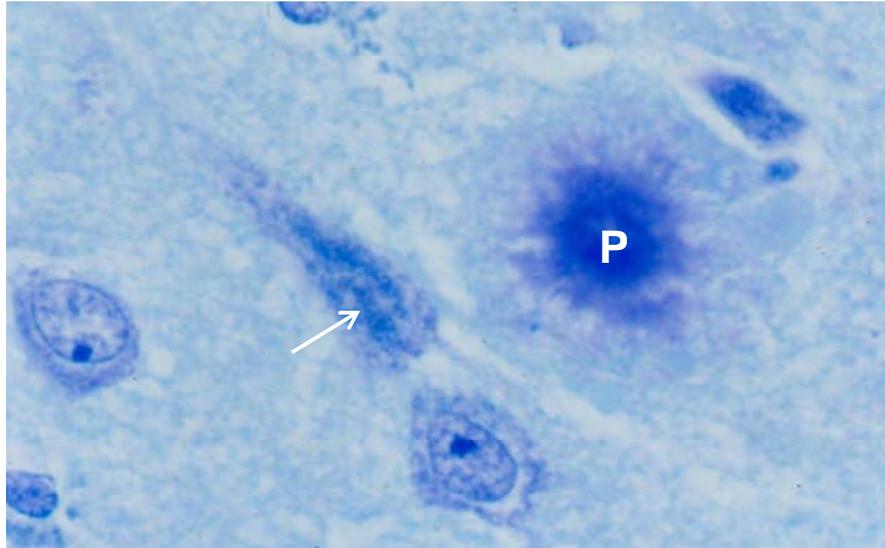


Fig. 11 Imagen del parénquima cerebral se observa una placa prion (P), esta estructura es de forma esférica con proyecciones de forma radiada alrededor como un color violeta claro. Además hay algunas neuronas (flechas). Tinción de azul de toluidina. 40x.

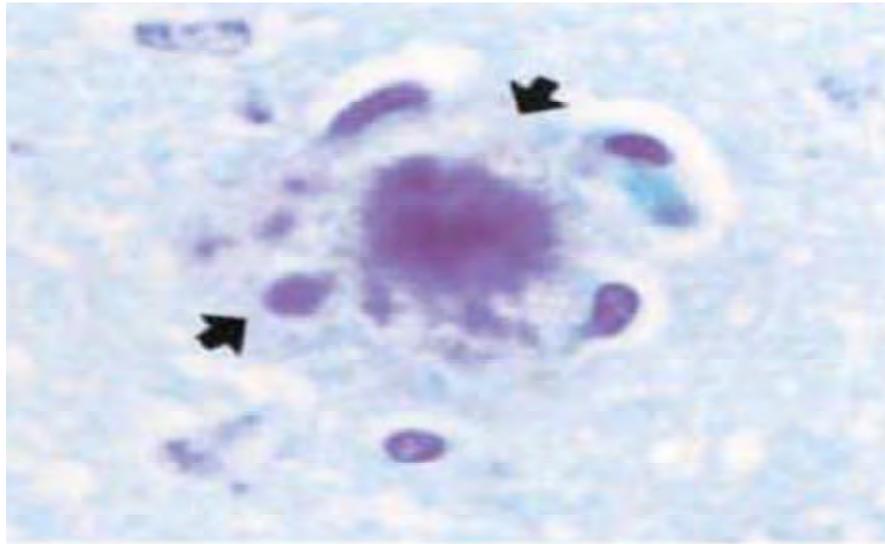


Fig. 12 Placa prion de forma esférica con proyecciones de forma radiada alrededor como un color violeta claro. Hay presencia de placas pequeñas (flechas). Tinción de azul de toluidina. 40x.

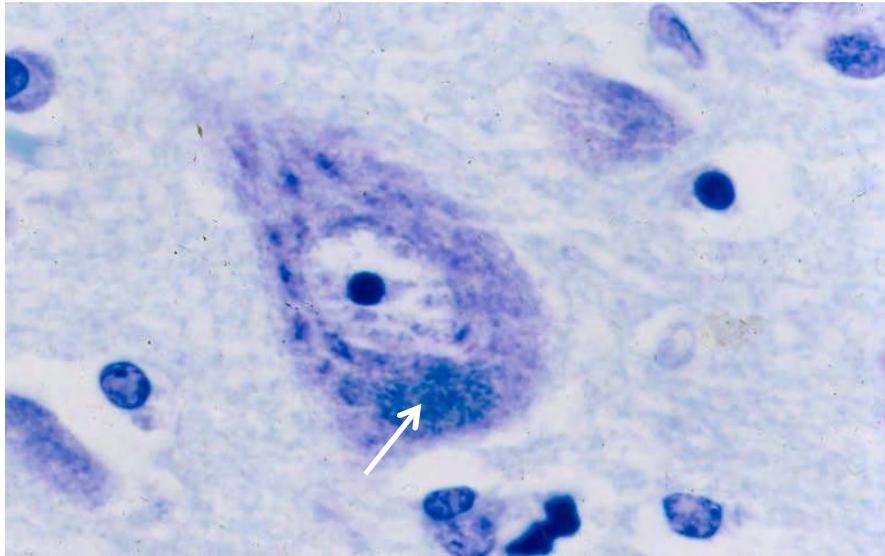


Fig. 13 Neurona teñida con azul de toluidina, donde se observan depósitos intraneuronales (flecha). 40x.

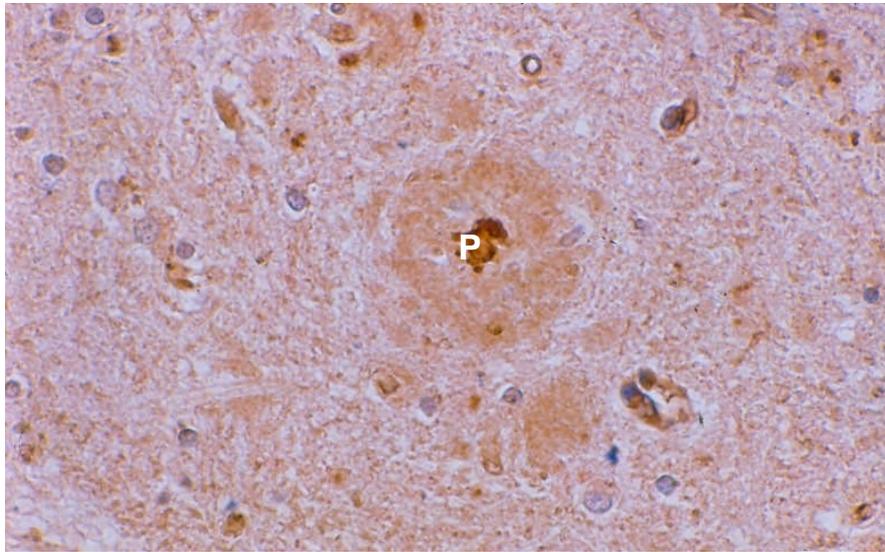


Fig. 14 Imagen del parénquima cerebral se observa una placa prion (P), con un depósito de PrP^{sc} y proyecciones de forma radiada. Inmunohistoquímica para detectar PrP^{sc}. 10x.

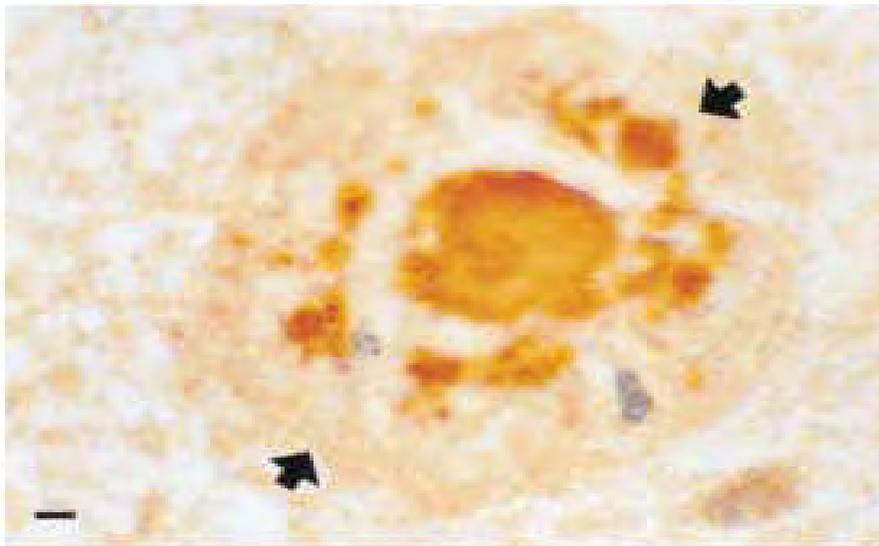


Fig. 15 Placa prion de gran tamaño rodeada de por pequeñas placas (flechas). Esta imagen es parecida a la que se obtiene con la tinción de azul de toluidina. Inmunohistoquímica para detectar PrP^{Sc} 40x.

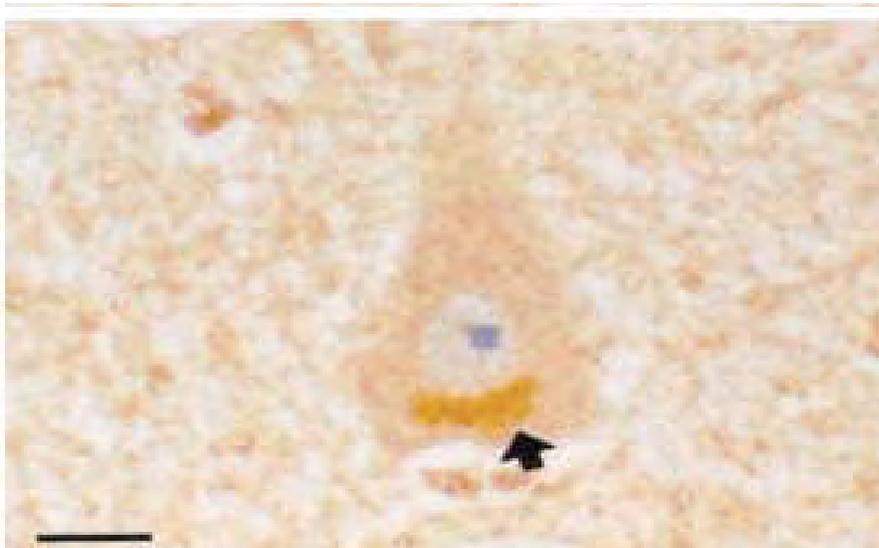


Fig. 16 Neurona de la corteza cerebral que presenta depósitos neuronales que contiene depósitos de PrP^{Sc} (flecha), esta imagen es parecida a la que se obtiene con la tinción de azul de toluidina. Inmunohistoquímica para detectar PrP^{Sc}.10x.

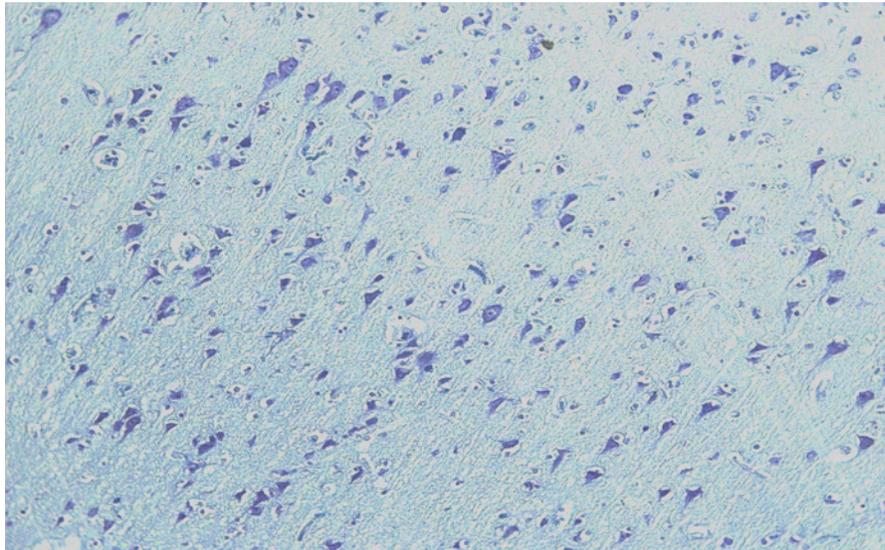


Fig. 17 Imagen de la corteza cerebral de un paciente con enfermedad de Alzheimer donde solo se distinguen los cuerpos neuronales, no se observan las placas neuríticas características de esta enfermedad. Tinción de azul de toluidina. 10x.

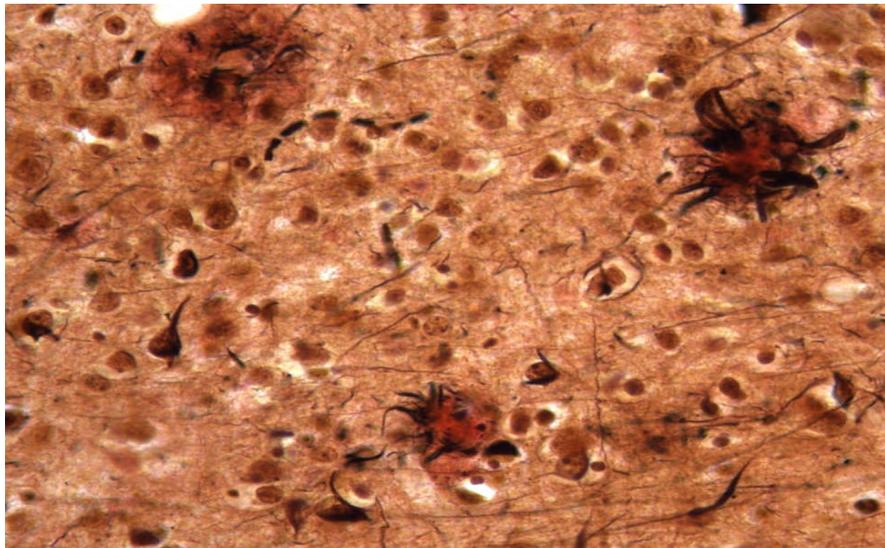


Fig. 18 Corteza cerebral de un paciente con enfermedad de Alzheimer teñido con la técnica de Bielschowsky, se observan las placas neuríticas características de esta enfermedad, lo que no se observa en el caso de GSS con las placas prion .10x.

11. DISCUSIÓN

Las EETs o enfermedades por priones son entidades que muestran diferentes características clínicas y neuropatológicas. Estas enfermedades exhiben variaciones fenóticas en la expresión de procesos patológicos comunes como son la degeneración y muerte neuronal en ausencia de inflamación y respuesta inmune. En muestras de cerebros con estas enfermedades se puede apreciar que cambios neuropatológicos no específicos, como son: cambios espongiiformes, degeneración neuronal y la presencia de astrocitosis. Estos cambios sustentan parte del diagnóstico postmortem y, estos son la primera pista para la identificación de estas enfermedades (Hadlow, 1999).

En las observaciones que realizamos en 15 regiones del encéfalo de un enfermo con GSS teñidas con las técnicas de Hematoxilina y Eosina y azul de Toluidina, se pudo apreciar los cambios descritos por Hadlow como son el espongiosis, la degeneración y muerte neuronal, y la presencia de una gran cantidad de astrocitos.

Las patogénesis de las enfermedades por priones esta ligada a la expresión y acumulación de una forma estructuralmente aberrante y proteasa resistente de la PrP^C que se denomina PrP^{Sc}, que es una isoforma y que difiere principalmente a la manera como se pliega la PrP^C, ya que presenta una mayor cantidad de arreglos β -plegados en la conformación tridimensional de la proteína, estas propiedades le confieren a la PrP^{Sc} su capacidad amiloidogénica con una fuerte tendencia a la agregación para la formación de

fibrillas o incluso cúmulos mayores conocidos como placas prion. Se plantea que la generación de PrP^{sc} se debe a una mutación en el gen que la produce, lo que da origen a las enfermedades por priones hereditarias, o por interacción de la PrP^{sc} con la PrP^c en la membrana celular o en interior celular, lo que permite la aparición de los casos infecciosos de estas enfermedades (Collins y cols., 2004).

En las muestras de los pacientes con GSS se observó cúmulos de la PrP^{sc}, cuando se utilizó la técnica de tinción de azul de Toluidina que es una técnica específica para detectar glicoproteínas de tipo mucínico simple, la cual ayuda a identificar a la PrP^{sc} como fue reportado en nuestro grupo en 2001. En las muestras de GSS se localizan cúmulos de forma circular de gran tamaño denominado placas prion, principalmente en el cerebelo y algunas áreas de la corteza cerebral, y estas placas son una característica distintiva de esta enfermedad. Para corroborar si estos cúmulos teñidos con azul de Toluidina eran depósitos de PrP^{sc}, se realizó la técnica de inmunohistoquímica para detectar la PrP^{sc}, y se obtuvo como resultado estructuras positivas a esta técnica y las mismas que se tiñan con azul de toluidina. Además con la técnica de inmunohistoquímica y la técnica de azul de toluidina se pudieron identificar depósitos intraneuronales de la PrP^{sc}.

En nuestro estudio observamos por medio del análisis histoquímico, que los cambios patológicos más severos fueron localizados en el cerebelo y el hipocampo, donde se observó la pérdida de células de la capa granulosa y Purkinje. Las placas prion que se localizaron con el azul de toluidina y el

anticuerpo anti-prion, mostraron una densidad mayor de placas en el parénquima del cerebelo, en las capas de: células de la granulosa, y una menor extensión entre las células de Purkinje. Las placas multicentricas son abundantes en cerebelo como en hipocampo. En nuestro experimento, nosotros demostramos que la técnica con azul de toluidina fue capaz de teñir a la mayoría de las de placas reconocidas por el método de inmunohistoquímica. Esto puede indicar el grado de maduración de las placas prion. En contraste la tinción de azul de toluidina únicamente reconoce placas maduras, con el método anti-prion se reconocen diferentes tipos de placas incluyendo los depósitos pequeños multicentricos de proteína prion, por lo que marca la diferencia de identificación del porcentaje total de placas marcadas por el azul de toluidina y por la técnica de inmunohistoquímica. Siguiendo la distribución de las placas teñidas por método de azul de toluidina estudiadas en las 15 regiones del encéfalo, nosotros demostramos que los estructuras teñidos con azul de toluidina y el anticuerpo anti-prion son los mismos, igualmente en todos los casos. Las placas teñidas con azul de toluidina son idénticas a las reconocidas por el anticuerpo anti-prion, indicando la alta sensibilidad de este método. En el tejido de Alzheimer, el azul de toluidina fue incapaz de teñir placas β -amiloide o las marañas neurofibrilares, que son características de la enfermedad de Alzheimer (Khachaturian 1985; McKhann y cols. 1984). El azul de toluidina permite distinguir entre placas prion y placas de β -amiloide, ofreciendo posibilidades para el diagnóstico postmortem. En contraste las técnicas de rutina como hematoxilina y eosina y PAS, el azul de toluidina permite identificar depósito de PrP^{Sc} y ofrece un gran contraste entre los componentes tisulares. El azul de toluidina es utilizado para teñir sobre todo

mucopolisacáridos (Sheehan y Hrapchak 1973). Las placas prion maduras se tiñen con el azul de toluidina de un color azul oscuro debido a que en ellas encontramos varios tipos de glúcidos como son los glicosaminoglicanos (GAG) que son polisacáridos de la matriz extracelular y los oligosacáridos que se encuentran combinados con la proteína prion, por el mecanismo de glicosilación que consiste en la adición covalente de los oligosacáridos con las proteínas, este fenómeno puede ser otra posible explicación de por que el azul de toluidina tiñe a las placas de proteína prion. Sea sugerido que la glicosilación puede contribuir a los cambios conformacionales de la proteína en Alzheimer y facilitar su propia agregación (Guevara et al. 1998). Cambios similares pueden también presentarse en los cambios conformacionales o fallas en el proceso de transformación de la PrP^{Sc} (Aguzzi y Brandner 1999, Cohen 1999; Serio et al. 2000). Por lo que en estas condiciones, el azul de toluidina tiñe depósitos de PrP^{Sc}, pero no en los depósitos de β -amiloide en cerebros Alzheimer implican una diferencia conformacional espacial.

12. Conclusión

- 1.- La técnica de rutina histopatológica hematoxilina y eosina no es una técnica útil para el diagnóstico histopatológico de la enfermedad de GSS
- 2.-El azul de toluidina permite distinguir depósitos intracelulares de PrP^{sc} y placas prion, ofreciendo alta calidad de contraste para el diagnóstico histopatológico de la enfermedad de GSS
- 3.-La técnica de azul de toluidina ayuda a distinguir evidentemente las placas prion de las placas β -amiloide, abriendo varias posibilidades para el diagnóstico post-mortem.
- 4.- En el tejido normal de encéfalo, el azul de toluidina permite observar un alto contraste de tinción de las neuronas normales. Este método de tinción puede ser utilizado como un método de rutina para el tejido cerebral.

13. Bibliografía

-Aguzzi, A.; Bitfler, T.; Klein, M.; Brandner, S.; Raeber, A.; Flechsing, E. y C. Weissmann. 1997. *Neurotoxicity and Neuroinvasiveness of prions*. Brain Pathol 7: 1137-1138.

-Aranda, A. 1992. *Possible cell-free Prion replication*. Med Hypotheses 38:249-251.

-Arango JC, Fernández GS, Ardila A. *Las demencias. Aspectos clínicos, neuropsicológicos y tratamiento*. Editorial El Manual Moderno. Colombia Bogota pag.445

-Belay, E.D. 1999. *Transmissible spongiform encephalopathies in humans*. Ann. Rev. Microbiol. 53:283-314.

-Bell, J.E. y J.W. Ironside. 1993. *Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans*. Brain Med Bull 49: 738-777.

-Brockes, J. 1999. *Topics in prion cell biology*. Current Opinion in Neurobiol 9:571-577.

-Brown, P.; Gibbs, C.J.; Rogers-Johnson, P.; Asher, D.M.; Sulima, M.P. y A. Bacote. 1994. *Human Spongiform Encephalopathy: the National of Health series of 300 experimentally transmitted disease*. Ann of Neurol. 35: 513-529.

-Brown, D.R. 2001. *Prion and prejudice: normal protein and the synapse*. Trends of Neuroscience. 24; 2:85-90.

-Cashman NR, Caughey B. 2004. *Prion diseases, close to effective therapy?* Nat Rev Drug Discov;10:874-884.

- Castilla J, Hetz C, Soto C. *Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein*. *Curr Mol Med* 2004;4:397-403
- Clausen H, Benneth EP. *One family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases control the initiation of micin-type O-linked glycosylation*. *Glycobiology* 1996;6:635-646.
- Chen PY, Lin CC, Chang YT, Lin Sc, Chan SI. *One O-linked sugar can affect the coil-to-beta structural transition of the prion peptide*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12633-12638.
- Cohen, F.E. 1999. *Protein misfolding and prion diseases*. *J Mol Biol* 293:313-320.
- Cohen, F.E.; Pan, K.M.; Huang, Z.; Balwing, M.; Fletterick, R.J. y S. Prusiner. 1994. *Structural clues to prion replication*. *Science* 264:530-531.
- Coria B., F. 2002. *Demencias por priones*. Ed: Alberca R, López Pousa YS. *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias*. Médica Panamericana. España.
- DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, and Prusiner SB. 1987. *Changes in the localization of brain prion protein during scrapie infection*. *Neurology*. 37:1271-1280.
- DeArmond SJ, Sánchez H, yehiely F, Qui Y, Ninchak-Casey A, Daggett V, Camerino AP, Cayetano J, Roger M, Groth D, Torchia M, Tremblay P. Scott Mr, Cohen FE, Prusiner SB. *Selective neuronal targeting in prion disease*. *Neuron*. 1997 Dec; 19(6):13:37-48.
- DebBurman, S.; Raymond, G.; Caughey, B. y A. Lindquist. 1997. *Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form*. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*. 94:13938-13943.

- Diedrich JF, Bendheim PE, Kim YS, Carp RI, Haase AT. *Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jan 15;88(2):375-9.
- Diomede L, Sozzani S, Luini W, Algeri M, De Gioia L, Chiesa R, Lievens PM, Bugiani O, Forlini G, Tagliavini F, and Salmona M. *Activation effects of a prion protein fragment [PrP-(106-126)] on human leucocytes*. *Biochem J*. 1996 Dec. 1;320 (Pt2):563-570.
- Dormont, D. 2002. *Prion diseases: pathogenesis and public health concerns*. *FEBS Letters* 529: 17-21.
- Espinosa B, Guevara J, Hernández P, Slomianny MC, Guzmán A, Martínez-Cairo S, Zenteno E. *Characterization of an O-glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer's disease brain*. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:34-41.
- Fernández-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. *Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins*. *Nat Biotechnol* 2004;10:1302-1306.
- Forloni G, Del Bo R, Angeretti N, Chiesa R, Smiroldo S, Doni R, Ghibaudi E, Salmona M, Porco M, Verga et al. *A neurotoxic prion protein fragment induce rat astroglial proliferation and hypertrophy*. *Eur J neurosci*. 1994 sep 1;6(9):1415-22
- Gasset, M. 1996. *El prion, una herejía científica en la vida cotidiana*. *Fronteras de la Ciencia y Tecnología (Francia)* 13:4-6.
- Georgieva D, Koker M, Redecke I, Perbandt M, Clos J, Bredehorst R, Genov N, Betzel C. *Oligomerization of the proteolytic products is an intrinsic property of prion proteins*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1278-1286.

- Guevara J, Espinosa B, zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G, Mena R. *Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer Disease*. J. Neuropathol Exp Neurol 1998;57:905-914.
- Hadlow WJ.1999 *Reflections on the Transmissible Spongiform Encephalopathies*. Vet Pathol. 36:523-529
- Hainfellner, J.A.; Liberski, P.P; Guiroy, D.C.; Cervenakova, L.; Brown, P.; Gajdusek, D.C. y H. Budka. 1997. *Pathology and Immunocytochemistry of a Kuru Brain*. Brain Pathol 7:547-553.
- Hölscher, C.; Bach, U.C. y B. Dobberstein. 2001. *Prion Protein Contains a Second Endoplasmic Reticulum Targeting Signal Sequence Located at its C Terminus*. Journal of Biological Chemistry 276 (16):13388-13394.
- Horiuchi, M.; Yamazaki, N.; Ikeda, T.; Ishiguro, N. y M. Shinagawa. 1995. J. Gen. Virol. 76:2583-2587.
- Jarrett, J. y P.T. Lansbury. 1993. *Seeding "One-Dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and Scrapie?*. Cell 73:1055-1058.
- Kocisko, A.; Come, H. y A. Priola. 1994. *Cell free formation of protease resistant prion protein*. Nature 370:471-474.
- Kuwata, K.; Li, H.; Yamada, H. Legname, G.; Prusiner, S.; Akasaka, K. y T. James. 2002. *Locally disordered conformer of the hamster prion protein: A crucial intermediate to PrP^{Sc}?* Biochem 41:12277-12283.
- Liberski, P.P. y D.C. Gajdusek. 1997. *Kuru: Forty years later, a historical note*. Brain Pathol 7:555-560.

- Liemann, S. y R. Glockshuber. 1999. *Influence of amino acid substitutions related to inherited prion disease on the thermodynamic stability of the cellular prion protein.* Biochem 38:3258-3267.
- Martins, V.R. y R.R. Brentani. 2002. *The biology of the cellular prion protein.* Neurochem International 41:353-355.
- Masters, C.L. y K. Beyreuther. 1997. *Tracking turncoat prion proteins.* News and Views. Nature 388:228-229.
- Miyazono M, Iwaki T, Kitamoto T, Kaneko Y, Doh-ura K, Tateishi J. *A comparative immunohistochemical study of Kuru and senile plaques with a special reference to glial reactions at various stages of amyloid plaque formation.* Am J Pathol 1991 sep;139(3):589-98.
- Nandi, P.K.; Leclerc, E. y D. Marc. 2002. *Unusual property of prion protein unfolding in neutral salt solution.* Biochem 41:11017-11024.
- Pan, K.M.; Baldwin, M.A.; Nguyen, J.; Gasset, M. y A. Serban. 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.
- Prusiner, SB. 1982. *Novel Proteinaceous Infectious Particles cause Scrapie.* Science 216; 9:136-144.
- Prusiner SB.1984. *Prions: novel infectious pathogens.* Adv Virus Res;29:1-5.
- Prusiner, S. 1995. *El prion en la patología.* Investigación y Ciencia. Marzo: 14-21.
- Quaglio, E.; Chiesa, R. y A. Harris. 2001. *Copper converts the Cellular prion protein into a protease-resistant species than is distinct from the scrapie isoform.* J Biol Chem 276;14:11432-11438.

- Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler Sf, Harvey DJ, et al. *Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms*. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:13044-13049.
- Satheeshkumar KS, Murali J, Jayakumar R. *Assemblages of prion fragments novel model systems for understanding amyloid toxicity*. J Struct Biol 2004;148:176-193.
- Sheehan DC, Hrapchak BB. 1973 Carbohydrates In: Sheehan DC, Hrapchak Bb 8eds). *Theory and practice of histotechnology*. Mosby, St. Louis, pp 93-94.
- Stahl, N.; Baldwin, M.A.; Burlingame, A. y S. Prusiner. 1990. *Identification of Glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein*. Biochem 29; 38:8879-8884.
- Salmona M, Forloni G, Diomede L, Algeri M, De Gioria L, Angeretti N, Giacchine G, Tagliavini F, Bugiani O. *A neurotoxic and gliotrophic fragment of the prion protein increases plasma membrane microviscosity*. Neurobiol Dis. 1997;4(1):47-57.
- Snow Alan D, Wight Tn, Nochlin D, Koike Y, Kimata K, Stephen J, DeArmond, and Stanley B. Prusiner. 1990. *Immunolocalization of Heparan Sulfate Proteoglycans to the Prion Protein Amyloid Plaques of Gerstmann-Straussler Síndrome, Creutzfeldt-jakob Disease and Scrapie* .laboratory Investigation. Vol. 63, No. 5, p.601.
- Weihl, C.C. y R.P. Ross. 1998. *Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, nueva variedad de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, y la encefalopatía espongiiforme bovina*. En: *Clínicas Neurológicas de Norteamérica. Infecciones del Sistema Nervioso Central*. Vol. 4/1999. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Weissmann, C. 1999. *Molecular genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies*. J Biol Chem 274;1:3-6.

- Zahn, R.; Liu, A.; Lührs, T.; Riek, R.; Von Schroetter, C.; López, F.; Billeter, M.; Calzolari, L.; Wider, G. y K. Wüthrich. 1999. *NMR solution structure of human prion protein*. PNAS 97:145-150
- Zhang, H.; Stockel, J.; Mehlhorn, I.; Groth, D.; Baldwin, M.A.; Prusiner, S.; Lames, T.L. y F. Cohen. 1997. *Physical studies of conformational plasticity in a recombinant Prion protein*. Biochem 36: 3543-3553.