

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PrP<sup>Sc</sup> Y SU RELACIÓN CON EL  
PROCESAMIENTO PATOLÓGICO DE LA PROTEÍNA TAU EN  
HIPOCAMPO Y CEREBELO EN LA ENFERMEDAD DE  
CREUTZFELDT-JAKOB”**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA**

**IBQ. VICTOR MANUEL GÓMEZ LÓPEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y  
MOLECULAR**

**DIRECTOR: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO**

**CIUDAD DE MÉXICO**

**ABRIL, 2018**

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que toda la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento, provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en el Banco Nacional de Cerebros “Dr. Raúl Mena López”, y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial y de la Ley Federal del Derecho de Autor, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Firma: \_\_\_\_\_

Victor Manuel Gómez López

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo a través de la beca numero 590011 otorgada para realizar los estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN y a todo el personal que ahí labora por el buen trato que recibí desde mi llegada y por las facilidades proporcionadas en cuanto a material de laboratorio e instalaciones.

Al Banco Nacional de Cerebros “Dr. Raúl Mena López”, por el acceso sin restricciones al tejido necesario para los experimentos llevados a cabo en este trabajo.

Al Dr. Benjamín Florán Garduño por la dirección de esta tesis y más importante por brindarme la oportunidad de incursionar directamente en la investigación científica en el tema que me apasiona.

A los Doctores Petra Yescas Gómez y José Segovia Vila por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.

Mi profunda gratitud y reconocimiento al Dr. José Luna Muñoz, coordinador del Banco Nacional de Cerebros “Dr. Raúl Mena López”, por sus consejos, orientaciones y excelente asesoría en el desarrollo de la tesis; y especialmente por no dejar de creer en mí aun después de mis altibajos, gracias por motivarme a seguir adelante.

A la M.C. Amparo Viramontes Pintos por compartir su experiencia técnica, sus conocimientos y por su gran aprecio.

A mis compañeros de laboratorio Leonel, John, Sandy y Nayeli por brindarme su apoyo, sus consejos, por aceptarme tal como soy y por contribuir en concretar esta etapa de mi vida.

A todos aquellos que colaboraron directa e indirectamente con este trabajo, mis compañeros y amigos de graduación Ernesto, Manuel, Fany, Gerardo, Belén y Eduardo, un honor y un gran privilegio haber compartido con ustedes esta etapa de mi carrera profesional.

## **DEDICATORIAS**

...A mis abuelos, Consuelo (QEPD) y Clemente, y a mis padres Carmen y Susana por ser mi guía en la vida, por su amor incondicional y por apoyarme a realizar todas mis metas, aun después de haberlos defraudado en innumerables ocasiones. Gracias por sus sacrificios.

...A mis hermanos Héctor Hugo, Antonio y Cristel por su cariño y apoyo, pero por sobre todo por estar en las buenas y en las malas compartiendo mis alegrías y mis tristezas. A mis sobrinos Gladys, Luis, Emilio y mi tierna sobrinita Susi por darle importancia a mi vida.

...A todos mis tíos y primos por la gran familia y unión que representamos.

...A Denisse Becerra por ser mi mejor amiga y mi confidente, pero en especial por darme valor moral en todos los momentos en que lo necesite.

Gracias por sus ánimos constantes durante estos dos años, gracias por ayudarme a recuperar la sonrisa cada vez que algo me la borraba. Gracias a todos por creer siempre en mí.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRAC

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Las EETs: Reseña histórica .....	4
2.2 Clasificación de las EETs .....	6
2.3 Características clínicas y diagnóstico de las prionopatías humanas .....	10
2.3.1 <i>Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob</i> .....	10
2.3.2 <i>Síndrome de Gertsmann-Straussler-Scheinker</i> .....	12
2.3.3 <i>Insomnio Familiar Fatal</i> .....	13
2.3.4 <i>Insomnio Fatal Esporádico (IFe)</i> .....	13
2.4 Fisiopatología de las enfermedades priónicas .....	14
2.5 Proteína priónica.....	14
2.6 Papel de la proteína tau en enfermedades priónicas .....	15
2.7 Proteína tau en la Enfermedad de Alzheimer .....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS .....	21
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
6.1 Tejido cerebral.....	22
6.2 Casos clínicos .....	22
6.3 Anticuerpos .....	23
6.4 Inmunofluorescencia .....	23
6.5 Inmunohistoquímica .....	24

7. RESULTADOS .....	25
7.1 Expresión de la PrP <sup>Sc</sup> en el cerebelo.....	25
7.2 Hiperfosforilación de Tau en cerebelo .....	27
7.3 Hiperfosforilación de tau en hipocampo .....	29
7.4 Muerte celular en el cerebelo .....	35
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	45
10. PERSPECTIVAS .....	46
11. BIBLIOGRAFÍA.....	47
12. ANEXOS .....	56
10.1 Casos examinados <sup>1</sup> hasta febrero de 2017 en EU por el <i>National Prion Disease Pathology Surveillance Center</i> . .....	56

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS MUTACIONES Y POLIMORFISMOS DEL GEN <i>PRNP</i> HUMANO. ....	8
FIGURA 2.- ESTRUCTURA DE LA PRP <sup>C</sup> .....	15
FIGURA 3.- INMUNOREACTIVIDAD DEL ANTICUERPO AT8 (FOSFO-PHF-TAU SER202/THR205) Y SU ASOCIACIÓN A LAS PLACAS DE LA PRP <sup>SC</sup> EN EETS HUMANAS.....	16
FIGURA 4.- SITIOS DE FOSFOLIRACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU Y EPÍTOPES ESPECÍFICOS DE LOS ANTICUERPOS MÁS USADOS PARA SU ESTUDIO .....	17
FIGURA 5.- MECANISMOS DE FOSFORILACIÓN, ENSAMBLE Y FORMACIÓN DE LAS MARAÑAS NEUROFIBRILARES.....	18
FIGURA 6.- EXPRESIÓN DE LA PRP <sup>SC</sup> EN EL CEREBELO CON GSS.....	25
FIGURA 7. EXPRESIÓN DE LA PRP <sup>C</sup> Y LA PRP <sup>SC</sup> EN EL CEREBELO.....	26
FIGURA 8. EXPLORACIÓN POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE LOS DEPÓSITOS DE PRP <sup>SC</sup> EN LAS DIFERENTES CAPAS DEL CEREBELO.....	27
FIGURA 9.- PATRONES DE INMUNOREACTIVIDAD SIMILARES CON EL ANTICUERPO PT231 EN EL CEREBELO EN EETS FAMILIARES Y ESPORÁDICAS .....	28
FIGURA 10.- PRESENCIA DE NEUROFILAMENTOS EN LOS CASOS DE ENFERMEDAD POR PRIONES.....	29
FIGURA 11.- INMUNOREACTIVIDAD DEL ANTICUERPO PT231 EN HIPOCAMPO.. .....	30
FIGURA 12.- INMUNOREACTIVIDAD DE PTAU231 EN EL <i>STRATUM ORIENS</i> Y EN LAS DENDRITAS DE LAS CÉLULAS PIRAMIDALES .....	31
FIGURA 13.- SECUENCIA DE CAMBIOS CITOESQUELÉTICOS EN LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 .....	32
FIGURA 14.- PATRÓN DE EXPRESIÓN DE TAU EN LA REGIÓN CA1. ....	34
FIGURA 15.- ASTROGLIOSIS EN LAS CAPAS DEL CEREBELO DE CASOS DE ENFERMEDAD POR PRIONES.....	35
FIGURA 16.- EXPRESIÓN DE LA MMP-9 EN LAS DIFERENTES CAPAS DEL CEREBELO. ....	36
FIGURA 17.- TINCIÓN DE CUERPOS APOPTÓTICOS EN EL CEREBELO.....	37
FIGURA 18.- DINÁMICA DE LA DISFUNCIÓN CEREBELAR EN LA ECJ.....	40
FIGURA 19.- CAMBIOS POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA TAU EN LOS HIPOCAMPOS DE PACIENTES CON CREUTZFELD-JAKOB.....	42
FIGURA 20.- ESQUEMA HIPOTÉTICO DEL AMBIENTE NEUROTÓXICO PRODUCIDO POR LA PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS REACTIVOS Y SU RELACIÓN CON LA PERDIDA DE FUNCIÓN DE LA PRP <sup>C</sup> .....	44

## **LISTA DE CUADROS Y TABLAS**

TABLA 1.- ETIOLOGÍA DE LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES HUMANAS Y ANIMALES.....	7
TABLA 2.- MUTACIONES Y SUS POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON LAS PRIONOPATÍAS GENÉTICAS HUMANAS.....	9
TABLA 3.- SÍNTOMAS CARACTERÍSTICOS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ECJ.....	11
TABLA 4.- ANTICUERPOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	23



## ABREVIATURAS

<b>AD</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>CG</b>	Capa granular del cerebelo
<b>CM</b>	Capa molecular del cerebelo
<b>ECJ</b>	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
<b>EETs</b>	Encefalopatías espongiiformes transmisibles
<b>GSS</b>	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
<b>IFF</b>	Insomnio Familiar Fatal
<b>MNF</b>	Maraña neurofibrilar
<b>Pre-MNF</b>	Pre-maraña neurofibrilar
<b>PrP<sup>C</sup></b>	Proteína Prión Celular
<b>PrP<sup>Sc</sup></b>	Proteína Prión Scrapie
<b>pTau</b>	Proteína tau fosforilada
<b>Sb</b>	Sustancia blanca del cerebelo

## RESUMEN

Actualmente se sabe que las Encefalopatías Espongiformes Trasmisibles (EETs) son una familia de trastornos neurodegenerativos poco frecuentes que afectan a animales y humanos. Dentro de este grupo destacan la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) en el ganado, y la Enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ) en humanos. El agente etiológico de las EETs, se denomina “Prión”, que corresponde a la forma alterada ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) de una proteína expresada ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) en las células nerviosas. La  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  es resistente a la degradación y puede inducir el plegamiento anormal de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  provocando una extensa espongiosis, gliosis y deposición de placas amiloides de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  que conducen al daño cerebral evidenciado por síntomas neurológicos que finalizan con la muerte del individuo en menos de un año. La ECJ, la menos rara de las EETs, tiene características clínicas iniciales que se entremezclan con los síntomas de otras demencias como el Alzheimer (EA), en la EA los agregados de proteína tau y las placas de  $\text{A}\beta$  son los eventos moleculares que inician la pérdida de memoria y el deterioro cognoscitivo. Sin embargo, en la ECJ es desconocido el papel de la proteína tau en correlación con las placas de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . En los cerebelos empleados en este estudio, se encontró únicamente la sobreexpresión de pTau-Thr231 en respuesta a la muerte neuronal en la capa granular. Así mismo, la expresión localizada de MMP-9 y de GFAP indican que la muerte de las células granulares es causada por la posible subversión de la función de los astrocitos. Por otro lado, el análisis de los cambios postraduccionales de tau en los hipocampos estudiados solo mostró la presencia de pTau en pre-MNFs y en inclusiones intraneuronales perinucleares en CA1 y CA2, demostrando que el procesamiento de tau en la ECJ es distinto del encontrado en la EA. Estos resultados sugieren el posible rol neuroprotector de la proteína tau en el cerebro en respuesta al ambiente tóxico provocado por el prión.

## ABSTRACT

It is now known that Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) are a family of rare neurodegenerative disorders affecting animals and humans. Within this group are Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in cattle, and Creutzfeld-Jakob Disease (CJD) in humans. The etiologic agent of TSEs is called "Prion", which corresponds to the altered form (PrP<sup>Sc</sup>) of an expressed protein (PrP<sup>C</sup>) in nerve cells. PrP<sup>Sc</sup> is resistant to degradation and may induce abnormal folding of PrP<sup>C</sup> causing extensive spongiosis, gliosis and deposition of PrP<sup>Sc</sup> amyloid plaques leading to brain damage evidenced by neurological symptoms that end with the death of the individual in less than one year. CJD, the least rare of TSEs, has initial clinical features that are intermingled with symptoms of other dementias such as Alzheimer's (EA), in AD the tau protein aggregates and A $\beta$  plaques are the molecular events that initiate the memory loss and cognitive impairment. However, the role of tau protein in correlation with PrP<sup>Sc</sup> plates is unknown in CJD. In the cerebellum used in this study, we found only overexpression of pTau-Thr231 in response to neuronal death in the granular layer. Likewise, localized expression of MMP-9 and GFAP indicate that the death of granular cells is caused by the possible subversion of astrocyte function. On the other hand, the analysis of post-translational tau changes in the studied hippocampus showed only the presence of pTau in pre-MNFs and in perinuclear intraneuronal inclusions in CA1 and CA2, demonstrating that tau processing in CJD is different from that found in the EA. These results suggest the possible neuroprotective role of tau protein in the brain in response to the toxic environment caused by the prion.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades priónicas o Encefalopatías Espongiformes Trasmisibles (EETs), como se les conoce colectivamente, son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas raras e incurables que afectan a humanos y animales. El agente etiológico de las EETs, se denomina “prión”, que corresponde a la forma alterada (PrP<sup>Sc</sup>) de una proteína con ancla Glicosilfosfatidilinositol (GPI) constitutiva de la membrana celular (PrP<sup>C</sup>, proteína prión celular) (Aguzzi, Sigurdson, & Heikenwaelder, 2008; Hetz, Maundrell, & Soto, 2003). La forma patológica es infectiva, capaz de producir la enfermedad, extremadamente resistente al calor y a otros métodos tradicionales de esterilización, que son efectivos contra otros patógenos (Prusiner, 1982). Una vez que la PrP<sup>Sc</sup> ha entrado al sistema nervioso se presentan signos neurológicos progresivos y cambios morfológicos degenerativos del sistema nervioso central, que invariablemente culminan con la muerte del individuo (Jeffrey & González, 2007). En los seres humanos estas condiciones alteran la función del cerebro, causando cambios en la memoria, la personalidad y la conducta; una disminución de las funciones intelectuales (demencia); y movimientos anormales, en particular dificultad en la coordinación de la marcha (ataxia) (du Plessis, 2008). Estas patologías se pueden agrupar de acuerdo a sus orígenes en: I) genéticas, si son debido a mutaciones en el gen codificante de la PrP<sup>C</sup>; II) esporádicas, si aparecen sin causa conocida aparente; o III) infecciosas, si deriva de la transmisión accidental del prión patógeno por procedimientos médicos o por la ingesta de alimento de origen EEB (Encefalopatía Espongiforme Bovina) (Imran & Mahmood, 2011; Institute of Pathology Case Western Reserve University, n.d.). Los periodos de incubación dependen del tipo de EETs aunque por lo general progresan de seis a nueve meses para los casos esporádicos, y hasta 10 años para algunos casos genéticos (Center for Disease Control and Prevention, n.d.; Imran & Mahmood, 2011). Aunque la prevalencia de las EETs es desconocida, aproximadamente 350 nuevos casos, solo de ECJ, son reportados anualmente en los Estados Unidos, aproximadamente el 10% del número total son del tipo genético. (“Creutzfeldt-Jakob Disease Foundation,” n.d.). En México los casos clínicos de ECJ reportados son muy escasos, pero la incidencia de las EETs a nivel mundial es de 1-3% para las iatrogénicas; 12-15% genéticas y el 85% para las esporádicas (“Creutzfeldt-Jakob Disease Foundation,” n.d.). El establecimiento de una base de datos es imperante para determinar su incidencia en el país.

La causa principal de estas enfermedades es la disfunción del cerebelo, sin embargo otros signos clínicos indican que también se encuentra afectado el tronco del encéfalo, el cerebro medio, el hipotálamo y la corteza cerebral (Gambetti et al., 2011; Mastrianni, 2014). El Dr. Daniel Carleton Gadjusek fue el primero en describir las tres etapas de progresión de la enfermedad del Kuru (erradicada), cuyos síntomas son generalmente comunes entre las enfermedades priónicas, por lo que la descripción de sus etapas se ha utilizado como primer criterio para el diagnóstico clínico de estas enfermedades. Durante la primera etapa, la fase ambulatoria, se manifiesta el daño cerebral incipiente. Los síntomas característicos de esta fase son: disartria (dificultad para hablar), temblor generalizado, pérdida de la capacidad para coordinar los movimientos e inestabilidad de la postura y la marcha (GAJDUSEK, GIBBS, & ALPERS, 1966; Gajdusek & Zigas, 1959). La segunda etapa, la fase sedentaria, caracterizada por la incapacidad de la persona para deambular independientemente, temblores más severos, ataxia y síntomas psiquiátricos (labilidad emocional y depresión). La degeneración muscular no es aún evidente, y los reflejos tendinosos son normales (GAJDUSEK et al., 1966; Gajdusek & Zigas, 1959). En la tercera etapa, la fase terminal: Incapacidad para sentarse independiente, ataxia severa (pérdida total de la coordinación muscular), temblores y disartria, incontinencia urinaria y fecal, disfagia. En esta etapa se produce la muerte entre convulsiones (GAJDUSEK et al., 1966; Gajdusek & Zigas, 1959).

El diagnóstico de estas enfermedades es sumamente difícil y en la gran mayoría de los casos el diagnóstico definitivo solo puede ser confirmado *post mortem* a través de pruebas inmunohistoquímicas contra la PrP<sup>Sc</sup> (Mastrianni, 2014). El principal problema al que se enfrentan los médicos a la hora de realizar un diagnóstico oportuno es que muchos de los síntomas son confundidos con los de otras enfermedades neurológicas como Alzheimer o Parkinson, inclusive las manifestaciones clínicas son heterogéneas entre las EETs, aunque los pacientes cursan con demencia rápidamente progresiva otras características neurológicas pueden ser escasas y el deterioro cognitivo puede ser variable dependiendo del tipo de prionopatía (Chi, Lee, Lu, Wu, & Soong, 2010). Algunos pacientes desarrollan las variantes esporádicas, dificultando su detección debido a que la mayoría de los diagnósticos moleculares están diseñados para las variantes genéticas; ECJf, GSS y IFF (Mastrianni, 2014). Las EETs de origen iatrogénico, que aunque son de menor incidencia también juegan un papel importante para el entendimiento de las características infecciosas de los priones,

recientemente se describió como el suelo representa un reservorio ambiental plausible de la PrP<sup>Sc</sup>, el prion puede persistir en el medio ambiente durante años, aumentando la infectividad de una especie a otra (Smith, Booth, & Pedersen, 2011). Se necesita una mejor comprensión de los procesos neurodegenerativos en común de las EETs genéticas, esporádicas y las iatrogénicas. En la actualidad no hay un diagnóstico formal establecido y tampoco existe tratamiento, por lo que resulta fundamental establecer un diagnóstico oportuno que pueda englobar a toda las EETs.

El objetivo de este trabajo es analizar la expresión de la proteína prión patológica y su relación con la proteína tau fosforilada en hipocampo y cerebelo de pacientes que fallecieron con la ECJ. Las placas neuríticas (PN) y las marañas neurofibrilares (MNF) definen histopatológicamente la enfermedad de Alzheimer (EA) y se asocian con deterioro cognitivo del paciente. Clínicamente en la ECJ la sintomatología inicial de esta enfermedad puede parecerse a la EA, sin embargo en la ECJ el deterioro cognitivo progresa de una forma súbita y rápida. Para determinar si los eventos moleculares, como la formación de agregados de tau se producen de forma dependiente y si juegan un papel importante en la ECJ, en este trabajo se planteó utilizar la caracterización histopatológica de la relación prión-tau mediante determinaciones inmunohistoquímicas para detectar las modificaciones postraduccionales de la proteína tau en la patogénesis de la proteína priónica, así como analizar el mecanismo de muerte implicado.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Las EETs: Reseña histórica

El descubrimiento de las enfermedades causadas por priónes causó un hito en el estudio de las enfermedades infecciosas y la medicina moderna, hasta antes del descubrimiento del prión se creía que todas las enfermedades de origen infeccioso eran causadas por bacterias, virus o protozoarios y que para que se llevara a cabo la infección era necesaria la presencia del material genético, ADN y/o ARN (Zabel et al., 2015). En 1732 se describió la primer EETs, el “*Scrapie*” (Tembladera) que afecta a ovejas y ocasionalmente cabras, los ganaderos observaban cambios de comportamiento, acompañados de signos neurológicos principalmente ataxia (pérdida de coordinación, generalmente en el tercio posterior), prurito (picor) e hiperestesia (alteraciones de la sensibilidad), y pérdida de peso (Jeffrey & González, 2007; Schneider, Fangerau, Michaelsen, & Raab, 2008). No fue sino hasta 1920 que los Neurólogos Hans Gerhard Creutzfeldt y Alfons María Jakob describieron los síntomas de una enfermedad en humanos que típicamente iniciaba con demencia y cambios de personalidad junto con deterioro de la memoria y problemas de coordinación muscular, así como insomnio y depresión (Zabel et al., 2015). La enfermedad sería llamada Creutzfeldt-Jakob (ECJ o *Creutzfeldt-Jakob Disease*, CJD, en inglés) y su etiología sería desconocida por los próximos 60 años.

De 1936-1938 Paul-Luis Chelle y Jean Cuillé demostraron la transmisibilidad del scrapie mediante la inoculación de tejido del SNC procedente de una oveja enferma a una oveja sana (Schneider et al., 2008). Por los mismos años Josef Gerstmann, Ernst Straussler e Ilya Scheinker reportaron por primera vez la enfermedad llamada Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), que en un principio confundieron con una extraña forma de la enfermedad de Huntington hasta que se percataron que solo individuos emparentados la padecían, indicando su carácter hereditario y que los síntomas eran similares al scrapie. El GSS es caracterizada por ataxia cerebelosa, deterioro cognitivo, paraparesia espástica (ligera dificultad en los movimientos de las extremidades inferiores) y trastornos del movimiento (Imran & Mahmood, 2011). Durante los años posteriores diversos grupos de trabajo sugirieron que un virus lento debía ser el agente causal del scrapie debido al largo período

de incubación de la enfermedad, siendo uno de los principales defensores Björn Sigurdsson quien describió y acuñó el concepto de Lentivirus en 1950 (Zabel et al., 2015).

Entre 1953 – 1959 se descubrió un trastorno neurológico entre la tribu Fore en Papua Nueva Guinea llamada Kuru (temblar de miedo) que presentaba similitudes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y el Scrapie (Gajdusek & Zigas, 1959), los datos recogidos por Gajdusek, Michael P. Alpers y la antropóloga Shirley Lindenbaum mostraron la distribución geográfica de la enfermedad, así como su predisposición por género y edad, donde el 60% de los casos estudiados eran mujeres adultas, el 2% varones adultos y el resto eran niños y adolescentes de ambos sexos, lo que apuntaba que el canibalismo ritual practicado por la gente Fore era el causante de la diseminación de la enfermedad (Alpers, 2008; Liberski, Sikorska, & Brown, 2012; Lindenbaum, 2008). El Dr. Carleton Gajdusek (Premio Nobel en 1976) demostró que tanto el Kuru como la ECJ se podían transmitir a chimpancés, donde los síntomas se presentaban de 13 a 18 meses después de la inoculación intracerebral de tejido procedente de personas enfermas (GAJDUSEK et al., 1966; Gibbs et al., 1968), sus estudios relacionaron tres enfermedades transmisibles (Kuru, ECJ y Scrapie) y que estas eran causadas por el mismo agente infeccioso con características de contagio diferente a los virus y bacterias.

Si bien el estudio del Kuru marcó un antes y un después en la medicina humana de la época, todavía se seguía pensando que el causante era un virus lento desconocido. No fue hasta la década de los 80's que Stanley B. Prusiner (Premio Nobel de Medicina, 1997) empleo protocolos que modifican la estructura de ácidos nucleicos (pH, nucleasas, modificaciones químicas, fotorreacción y radiación UV) y utilizó compuestos que degradan (Proteínasa K, Tripsina) e inactivan (detergentes, SDS; solventes orgánicos, fenol; modificación química, Dietilpirocarbonato) proteínas sobre extractos purificados de cerebros enfermos que eran inoculados en ovejas y cabras para estudiar las formas de alterar la capacidad infecciosa del scrapie (Prusiner, 1982). Sus resultados demostraron que el agente causal requerido para la infectividad del Scrapie era de naturaleza proteica debido a que el agente era resistente a la inactivación por procedimientos que modifican ácidos nucleicos y susceptible a los métodos que alteran a las proteínas. La partícula proteica "*proteinaceous infectious particle*" que se replicaba así misma en ausencia de material



genético recibió el nombre de Prión (***P**roteinaceous, **i**nfectious **o**nly*) lo que enfatizó su naturaleza proteica e infecciosa (Prusiner, 1982).

A mediados de los 80's se describió en el Reino Unido (RU) y posteriormente en otros países de Europa una enfermedad en el ganado vacuno cuyos síntomas característicos eran cambios en el comportamiento y pérdida de la coordinación, la enfermedad recibió el nombre de "mal de las vacas locas". Meses después del primer brote en el RU el Laboratorio Veterinario Central "Weybridge" confirmó que el ganado enfermo padecía de las características espongiiformes clásicas observadas en el scrapie, la EJC y el Kuru (G. A. Wells et al., 1987). Para investigar la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y las posibles consecuencias para la salud humana, diversos grupos de investigación realizaron un seguimiento exhaustivo del brote, patológica y epidemiológicamente, rastrearon la causa de la EEB a la elaboración de piensos con carne y harina de hueso de rumiantes infectados con el prión (G. A. H. Wells & Wilesmith, 1995; Wilesmith, Ryan, & Atkinson, 1991). Se dio comienzo a un programa de investigación a nivel mundial para la prevención de la EEB destinado a estudiar los signos clínicos y métodos de diagnóstico, la patología, patogénesis y epidemiología de la enfermedad y las propiedades de transmisión del prión entre el ganado para evitar la diseminación del agente (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2003). En 1995 se presentaron los primeros casos de pacientes jóvenes que mostraban síntomas similares a la EJC que por lo general afecta a personas de más de 55 años de edad, el análisis más exhaustivo reveló que los cerebros de estos pacientes mostraban inusuales lesiones espongiiformes similares a la EEB, la enfermedad recibió el nombre de "nueva variante" de EJC (ECJnv) (R G Will et al., 1996), los nuevos casos en humanos revelaban que los controles en los mataderos no estaban siendo estrictamente aplicados y como consecuencia el material altamente infeccioso pudo haber entrado al SNC de los pacientes al consumir carne contaminada con el agente de la BSE.

## **2.2 Clasificación de las EETs**

Las EETs son un grupo heterogéneo de enfermedades de muy baja prevalencia y con características clínicas variables que se agrupan de acuerdo a su huésped, en animales y humanas, y a su etiología si son origen genético, infeccioso o esporádico (Ver tabla 1). Las

EETs involucran modificaciones de la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>) que provocan su conversión en una isoforma alterada (PrP<sup>Sc</sup>) que le confiere resistencia a los métodos rutinarios de descontaminación y esterilización actualmente aceptados para la eliminación de virus, bacterias y hongos (Aguzzi, Nuvolone, & Zhu, 2013).

#### *EETs en animales*

Enfermedad	Huésped	Etiología	Descubrimiento
Scrapie	Ovejas/cabras	Infección con priones de origen desconocido	1732
TME	Visones	Infección con priones de origen ovino/caprino	1947
CWD	Cérvidos	Infección con priones de origen desconocido	1967
BSE	Bovinos	Infección con priones de origen desconocido	1986
EUE	Niala/Kudu	Infección con priones de origen BSE	1986
FSE	Felinos	Infección con priones de origen BSE	1990
NHP	Lémures	Infección con priones de origen BSE	1996

#### **EETs Humanas**

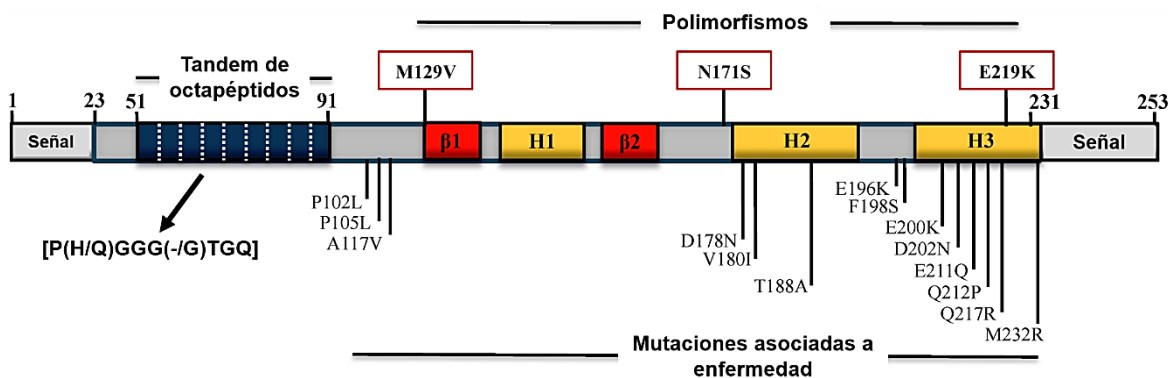
Enfermedad	Huésped	Etiología	Descubrimiento
Kuru	Humano	Canibalismo	1957
sCJD	Humano	Conversión espontanea PrP <sup>C</sup> .PrP <sup>Sc</sup> / mutación somática	1920
fCJD	Humano	Mutaciones en el gen PRNP	1294
GSS	Humano	Mutaciones en el gen PRNP	1936
iCDJ	Humano	Infección iatrogénica con priones de origen humano	1974
FFI	Humano	Mutación en el gen PRNP – D178N con poliformismo 129M	1986
nvCJD	Humano	Infección con priones de origen BSE	1996
sFI	Humano	Conversión espontanea PrP <sup>C</sup> .PrP <sup>Sc</sup> / mutación somática	1999
VPSPr	Humano	Conversión espontanea PrP <sup>C</sup> .PrP <sup>Sc</sup> / mutación somática	2008

**Tabla 1.- Etiología de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles humanas y animales.**

TME: Transmissible mink encephalopathy; CWD: Chronic wasting disease; BSE: Bovine spongiform encephalopathy; EUE: Exotic ungulate spongiform encephalopathy; FSE: Feline spongiform encephalopathy; NHP: TSE in non-human primates; CJD: Cruetzfeldt-Jacob disease; sCJD: Sporadic CJD; nvCJD: New Variant CJD; fCJD: Familial CJD; iCJD: Iatrogenic CJD; FFI: Fatal familial insomnia; GSS: Gertsman-Straussler-Scheinker syndrome; sFI: Sporadic fatal insomnia; VPSPr: Variably protease-sensitive prionopathy (Adaptado de Imran & Mahmood, 2011).

De acuerdo a la etiología, en humanos, las priónopatías esporádicas son producidas “de la nada” por la conversión espontánea de la PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>. Lo que inicialmente provoca la conversión del prión en las EETs de origen esporádico (ECJe, IFe, VPSPPr) es desconocido. Una hipótesis es que una o más neuronas pueden tener una mutación somática *de novo* en el gen de la PrP, produciendo la variante inestable y a una insuficiencia o fallo del sistema de control de calidad del retículo endoplásmico que reconoce proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR, del inglés) en la verificación de la conformación nativa de la PrP<sup>C</sup>, produciendo la proteína prión defectuosa (Gambetti & Notari, 2013).

Las priónopatías genéticas ocurren por mutaciones en el gen *PRNP* que codifica a la PrP<sup>C</sup>, en donde el gen anómalo se hereda de forma autosómica dominante. Las mutaciones pueden ser originadas por el cambio de un aminoácido por otro o la inserción de un aminoácido adicional. Se han descrito un gran número de mutaciones en el gen *PRNP* (Fig. 1) lo que ilustra la heterogeneidad fenotípica que varía no solo de una familia a otra sino también entre los casos en la misma familia (Mastrianni, 2014).



**Figura 1.- Representación esquemática de las mutaciones y polimorfismos del gen *PRNP* humano.** El gen *PRNP* codifica una proteína de 253 aminoácidos. La PrP<sup>C</sup> humana consiste en un péptido señal segmentado (1-22), un dominio desplegado que contiene un tandem de octapéptidos (OR, 51 - 91), tres hélices  $\alpha$  (H1, H2 y H3), una hoja  $\beta$  pequeña antiparalela B1 y  $\beta 2$ ), y una señal de anclaje GPI (232-253). Los polimorfismos y las mutaciones patógenas del gen *PRNP* se representan por encima y por debajo del esquema, respectivamente. Las letras que preceden a los números indican el residuo de aminoácido codificado normalmente y las letras que siguen los números designan el cambio de residuo (Adaptado de Acevedo-Morantes & Wille, 2014).

Las mutaciones más comúnmente encontradas en las EETs humanas se resumen en la tabla 2. Para el ECJf existen registradas 15 mutaciones (Gambetti, Kong, Zou, Parchi, & Chen, 2003). En el síndrome de Gertsman-Straussler-Scheinker (GSS) se han asociado 10

mutaciones que como consecuencia producen la enfermedad (Hsiao et al., 1992; Mastrianni, 2014; Schmitz et al., 2016; Tranchant et al., 1997). En el IFF solo está presente la mutación puntual Asp178Asn asociada a la presencia de Met en el codón 129.

Enfermedad	Mutaciones
ECJf	Pro105Thr, Asp178Asn – 129Val*, Arg148His – 129Met, , Val180Ile – 129Met, Thr183Ala – 129Met, Thr188Ala – 129Met, Thr188Lys, Thr188Arg, Glu196Lys – 129Met, Glu200Lys – 129Met, Val203Ile – 129Met, Arg208His – 129Met, Val210Ile – 129Met, Glu211Gln – 129Met y Met232Arg – 129Met
GSS	Pro102Leu, Pro105Leu, Ala117Val, Tyr145stop, Gln160stop, Phe198Ser, Gly131Val, Asp202Asn, Gln212Pro, y Gln217Arg.
IFF	Haplotipo Asp178Asn – 129Met*.

**Tabla 2.- Mutaciones y sus polimorfismos asociados con las prionopatías genéticas humanas.** Las mutaciones patogénicas y su polimorfismo asociado se representan de izquierda a derecha, respectivamente. Las letras que preceden a los números indican el residuo de aminoácido normal y las letras que siguen los números del nuevo residuo. \*: el cambio Met129Val con la misma mutación puntual, Asp178Asn, genera dos fenotipos clínicos distintos.

Varios grupos de investigación han identificado diversos polimorfismos comunes en el gen *PRNP* que no causan la enfermedad pero que pueden afectar el riesgo de desarrollar el trastorno en la persona. La presencia en el codón 129 de Met o Val se ha asociado a la susceptibilidad de contraer la ECJnv por exposición a la EEB. Por otro lado, el polimorfismo Met129Val también contribuye al fenotipo de la enfermedad, en personas con la mutación Asp178Asn, el alelo 129Val está presente en la ECJf, mientras que el fenotipo 129M es característico del IFF (Ver tabla 2) (Mastrianni, 2010).

El curso de la enfermedad también está influenciado por el codón 129, los individuos homocigotos 129MM presentan una progresión más rápida de la enfermedad mientras que individuos con el alelo 129VV muestran una progresión mucho más lenta. Además se han encontrado dos variantes polimórficas que parecen tener un efecto protector reduciendo el riesgo de desarrollar la enfermedad, en el codón 219 (Glu219Lys) en una familia japonesa (Shibuya, Higuchi, Shin, Tateishi, & Kitamoto, 1998) y en el codón 127 (Gly127Val) en una pequeña población de Nueva Guinea (Asante et al., 2015).

En las prionopatías adquiridas, la enfermedad es transmitida por exposición directa al prión, mediante la ingestión de tejido cerebral, ganglios de la raíz dorsal e intestinos infectados, como ocurrió con la ECJnv y el Kuru (Liberski et al., 2012; R G Will et al., 1996). Por otro lado se ha reportado de casos de transmisión humano-humano de la ECJe por trasplantes de duramadre, injertos de córnea y tratamientos con derivados de la hormona de crecimiento de origen humana obtenida de cadáveres (Sato, 2003; Robert G Will, 2003), así como por el material quirúrgico inadecuadamente esterilizado. A este tipo de casos se les llama iatrogénicos (ECJi) (Brown & Farrell, 2015).

Consumir carne infectada con BSE conlleva un gran riesgo de contraer la enfermedad, sin embargo no existen pruebas científicas de que el ser humano se contagie al consumir carne de ovejas o cabras infectadas de scrapie, o que en la cohabitación entre seres humanos y las ovejas enfermas exista un contagio directo (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007).

### **2.3 Características clínicas y diagnóstico de las prionopatías humanas**

Las prionopatías humanas tienen períodos de incubación largos, aunque el progreso de la enfermedad es inexorable y rápido una vez que aparecen los síntomas clínicos. Cinco enfermedades priónicas humanas son reconocidas actualmente: el Kuru, ECJ, ECJnv, GSS, y el IFF. Aunque los signos y síntomas se superponen entre ellas, es importante recalcar que en las EETs humanas se han empleado los encefalogramas (EEG) y las imágenes del cerebro por IRM (resonancia magnética) y PET (tomografía por emisión de positrones) para detectar el daño producido por la partícula priónica (Mastrianni, 2014). Los resultados de imageneología parecen depender de la variante de la enfermedad y la etapa en que se encuentre, por lo general las EEG muestran el daño de las áreas de la corteza cerebral, las IRM muestran el daño neurológico en la zona de los ganglios basales (caudado y putamen) y las PET muestran el daño en las regiones del hipotálamo (Chi et al., 2010; du Plessis, 2008; Kim & Geschwind, 2015; *Neurodegeneration and Prion Disease*, 2005).

#### **2.3.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob**

La ECJ se caracteriza por una demencia de rápido progreso cuyos síntomas típicos incluyen: cambios en la personalidad y deterioro cognitivo, del juicio y el pensamiento que

se vuelven más severos conforme progresa la enfermedad. Los pacientes también pueden experimentar insomnio, depresión, o sensaciones inusuales de pánico, así como alteración de la visión (Ver tabla 3), su incidencia es de 1 – 2 casos por cada millón de personas (Imran & Mahmood, 2011). También se presentan problemas con la coordinación muscular; a menudo desarrollan tirones musculares involuntarios (mioclonía). Eventualmente el paciente pierde la capacidad de moverse y hablar y finalmente entra en coma. Durante el progreso de la enfermedad los pacientes pueden seguir lo que está ocurriendo a su alrededor pero no son conscientes de su entorno. (Kim & Geschwind, 2015).

Fase	sCJD	fCJD	iCJD		nvCJD
			Periférica	Intracerebral	
Inicial	Depresión, cambios de humor, ansiedad y apatía. Pérdida de la memoria. Ataxia	Depresión. Anormalidades del comportamiento, cognitivas y problemas de memoria.	Disartria, temblor generalizado, pérdida de la capacidad para coordinar los movimientos e inestabilidad de la postura y la marcha.	Depresión, cambios de personalidad, ansiedad y apatía. Pérdida de la memoria y pensamiento.	Retracción social, depresión, ansiedad, somnolencia y agitación. Deliros y alucinaciones. Dolor persistente y entumecimiento.
Intermedia	Temblores, disartria espasticidad, mioclonía. Visión borrosa, insomnio y alucinaciones.	Fatiga y visión borrosa, ataxia, incontinencia y dificultad para hablar.	Incapacidad para deambular, temblores más severos, ataxia, labilidad emocional y depresión.	Temblores, disartria y mioclonía. Visión borrosa, insomnio y alucinaciones.	Olvido y confusión. Contracciones involuntarias y pérdida del equilibrio al andar.
Terminal	Pérdida del habla y de la capacidad de moverse. Dificultad para la deglución e incontinencia.	Mioclonía, rigidez, ceguera e incontinencia.	Pérdida total de la coordinación, temblores y disartria, incontinencia y disfagia.	Pérdida del habla y de la capacidad de moverse. Dificultad para la deglución e incontinencia.	Demencia progresiva y dificultad para comer y tragar. Incontinencia.
Edad	45 – 65 años	30 – 60 años	----		~28 años

**Tabla 3.- Síntomas característicos de los diferentes tipos de ECJ. (“Creutzfeldt-Jakob Disease Foundation,” n.d.).**

Existen cinco subtipos de ECJe asociados al polimorfismo M129V; la ECJe típica (MM1/MV1), de inicio temprano (VV1), de larga duración (MM2), con placas de Kuru (MV2) y la atáxica (VV2), donde los números corresponden con el patrón de migración electroforética de la proteína priónica patológica en: el tipo 1, con un peso molecular de 21 kDa, y el tipo 2 con un peso molecular de 19 kDa. Según sea el genotipo los síntomas clínicos pueden variar de persona a persona dificultando el diagnóstico donde lo que un paciente puede experimentar al principio de la enfermedad otro paciente puede no

presentarlo en absoluto (Gambetti et al., 2003). Una vez aparecen los primeros síntomas los pacientes mueren entre 1 – 6 meses, aunque en la variante de larga duración el paciente vivirá hasta 3 años. De igual manera en algunos subtipos, los primeros signos clínicos son la inestabilidad en la marcha seguido por los síntomas de demencia (Gambetti et al., 2003; Gambetti & Notari, 2013).

En el ECJf los síntomas pueden variar desde unos pocos meses hasta 2 años y varían dependiendo del tipo de mutación involucrada. El fenotipo clínico de la ECJf es semejante al ECJe en la duración y progresión pero suele presentarse en edades más tempranas. En algunos casos el desarrollo de la demencia es más lento y solo se presenta hasta etapas intermedias de la enfermedad. (Gambetti et al., 2003). Para la ECJi cuando la transmisión es intracerebral, los síntomas son más parecidos al ECJe. Sin embargo, la ECJi adquirida periféricamente tiene una sintomatología similar al Kuru, con ataxia predominante y sin síntomas evidentes de demencia (“Creutzfeldt-Jakob Disease Foundation,” n.d.).

### ***2.3.2 Síndrome de Gertsmann-Straussler-Scheinker***

La característica principal del GSS es una degeneración progresiva del cerebelo manifestada con pérdida de la coordinación, el equilibrio y el tono muscular, así como diferentes grados de demencia. Se estima que su incidencia es de 1 -10 por cada 100 millones de personas donde la causa más común es la mutación en el codón 102 que da lugar a un cambio de residuo Pro102Leu (Imran & Mahmood, 2011). Durante la fase inicial la disfunción cognitiva no está presente pero se hace más evidente conforme avanza la enfermedad. Los signos y síntomas se desarrollan generalmente entre las edades de 35 y 50 años, habitualmente, los primeros síntomas son torpeza e inestabilidad al caminar seguidos por disartria, nistagmo y sordera (Mastrianni, 2010). En la etapa tardía de la enfermedad se manifiesta la disfunción cognitiva con lentitud para pensar y diferentes grados de demencia (de leve a más severa). En las etapas finales de la enfermedad se pierde la coordinación y se presenta rigidez muscular afectando a los músculos que controlan la respiración, lo que aumenta el riesgo de neumonía, que es la causa más frecuente de muerte en estos pacientes (Schmitz et al., 2016).

### **2.3.3 Insomnio Familiar Fatal**

La atrofia del tálamo es uno de los signos más comunes del IFF aunque también se puede presentar atrofia leve en la corteza del lóbulo frontal. La edad de inicio de los síntomas es variable, de 20 a 60 años, y puede ser detectada antes del inicio por pruebas genéticas. Solo se han reportado 100 casos de IFF en 40 familias en Italia, Alemania, Austria, España, Reino Unido, Francia, Finlandia, Estados Unidos, Australia, Japón, China y Marruecos. (Imran & Mahmood, 2011).

Inicialmente la persona tiene insomnio creciente con la incapacidad para iniciar y mantener el sueño, lo que resulta en ataques de pánico, paranoia y fobias. Durante esta etapa también se perturba el sistema nervioso autónomo con síntomas persistentes y progresivos, que incluyen sudoración excesiva, salivación, pirexia nocturna, estreñimiento y elevación de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, esta etapa dura alrededor de 4 meses (Shi et al., 2010). Algunos pacientes presentan alucinaciones y confusión, así como deterioro gradual y progresivo de la memoria, asociados con apatía, depresión y cansancio, seguida por una rápida pérdida de peso (Montagna, Gambetti, Cortelli, & Lugaresi, 2003). Durante la etapa intermedia se observa el deterioro motor progresivo con dificultad para iniciar el caminar, desequilibrio al estar de pie, ataxia leve y mioclonía espontánea. En la progresión final de la enfermedad los pacientes se postran en cama y muestran un estado de mutismo acinético, experimentando insomnio más severo, empeoramiento de la ataxia y confusión. En última instancia, la muerte repentina de la persona ocurre de 8 – 72 meses después del desarrollo de los síntomas iniciales (Montagna, 2005).

Al igual que en la ECJ, la duración de la enfermedad depende del polimorfismo en el codón 129M, en los casos de individuos homocigotos MM la duración media de la enfermedad es de ~11 meses mientras que los casos de heterocigotos MV presentan una duración media mucho más larga, de ~23 meses (Schmitz et al., 2016).

### **2.3.4 Insomnio Fatal Esporádico (IFe)**

El IFF está ligado a la mutación Asp178Asn - 129Met en el gen *PRNP*, sin embargo, en 1999 se informó una enfermedad producida por priones de carácter esporádico con signos clínicos y neuropatológicos similares a los del IFF, pero que afecta a personas que no



parecen llevar la mutación en el gen *PRNP* ni antecedentes familiares de IFF (Moody et al., 2011; Parchi et al., 1999). Aunque las enfermedades priónicas son raras, es inaudito que se manifiesten en jóvenes menores de 20 años, en el 2014 se dio a conocer el caso de un niño de 13 años de edad con síntomas neurológicos similares al IFe y con un curso clínico de tres años, el análisis postmortem confirmó la presencia de placas de proteína prión y daño predominante en el tálamo, poniendo de manifiesto que un diagnóstico de enfermedad por priones no debe ser descartado en adolescentes que exhiben signos de deterioro neurológico de causa desconocida (Blase et al., 2014).

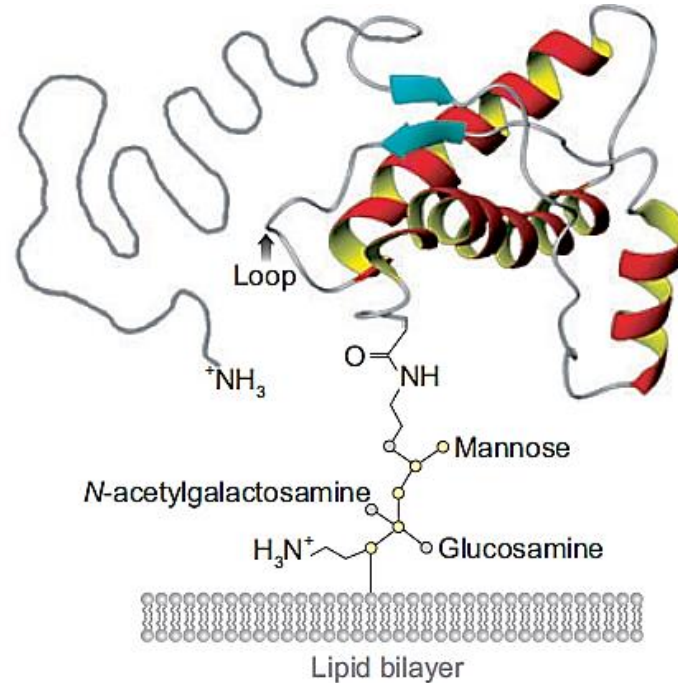
## **2.4 Fisiopatología de las enfermedades priónicas**

La degeneración espongiiforme es la principal característica que tienen en común las enfermedades priónicas y por lo general está se debe a la vacuolización que puede observarse al microscopio en el neurópilo de la corteza cerebral, la materia gris subcortical, y la sustancia blanca del cerebelo asociados con astrogliosis prominente y activación microglial (Schmitz et al., 2016). Los cambios neuropatológicos son indistinguibles entre las EETs, sin embargo, en el cerebelo, la pérdida extensa de células de Purkinje puede observarse con frecuencia en pacientes con GSS y Kuru. Los pacientes con IFF presentan una pérdida neuronal severa en los núcleos talámico anterior ventral y mediodorsal y el núcleo olivar inferior (Gambetti et al., 2011; Schmitz et al., 2016). Los pacientes con ECJe muestran daño predominante en la corteza cerebral y en el hipocampo, aunque la mayor diferencia entre los subtipos se muestra en el cerebelo donde, por ejemplo, en el subtipo ECJe-MV2 (con placas de Kuru) la pérdida neuronal no es muy marcada mientras que en el subtipo ECJe-VV2 (atáxica) hay una significativa pérdida neuronal en la capa molecular con pocos depósitos de PrP<sup>Sc</sup> (Gambetti et al., 2011).

## **2.5 Proteína prionica**

La proteína prionica celular (PrP<sup>C</sup>) humana es una glicoproteína de 253 aa codificada por el gen *Prnp*, este gen es de copia única y se localiza en el brazo corto del cromosoma 20. El gen consta de dos exones y se han descrito varios polimorfismos (ver apartado 2.2) siendo el codón 129 el responsable de la susceptibilidad al desarrollo de la prionopatía humana. La PrP<sup>C</sup> es altamente conservada en mamíferos y también se encuentra en reptiles y peces. Estructuralmente la PrP<sup>C</sup> está anclada a la membrana por un dominio GPI y posee

un peso molecular de 36 kDa (Fig. 2) (Aguzzi et al., 2008). La PrP<sup>C</sup> Se expresa abundantemente en el SNC en las neuronas y los astrocitos, aunque también se ha encontrado presente en los linfocitos.



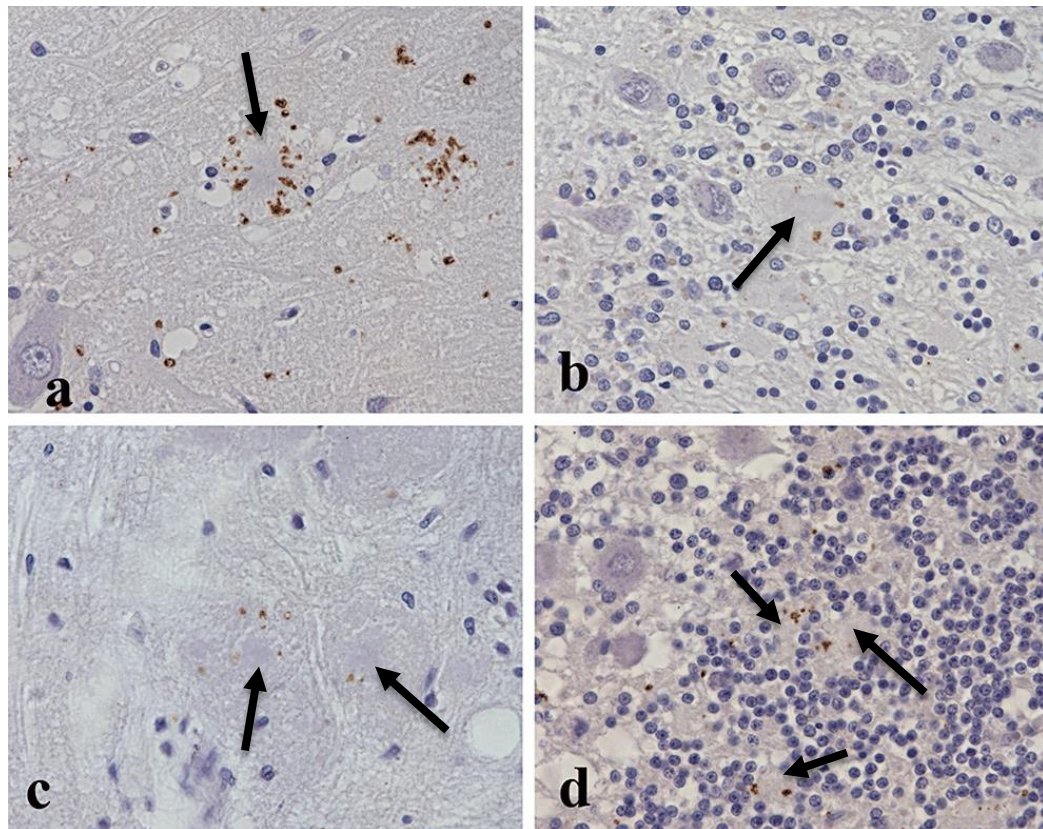
**Figura 2.- Estructura de la PrP<sup>C</sup>.** Dominio N-terminal: residuos 23-128 aa (Péptido señal: residuos 1-22). Dominio C-Terminal; Dos laminas  $\beta$  (residuos 129-131 y 166-168) y tres hélices  $\alpha$  (residuos 143- 152, 171-191 y 199-221). Loop: En la PrP<sup>Sc</sup> es rígido, en la PrP<sup>C</sup> es flexible. En la región N-Terminal se encuentra localizada una región de *octarepeats* capaces de unir  $\text{Cu}^{2+}$  y otros iones divalentes (Residuos 51-90, no mostrado). (Tomado de Aguzzi et al., 2008).

## 2.6 Papel de la proteína tau en enfermedades priónicas

La fosforilación de tau reduce su unión a las moléculas de tubulina y, por tanto, desestabiliza la dinámica de los microtúbulos, conduciendo a la neurodegeneración. La hiperfosforilación de tau, un sello distintivo en la EA, sin embargo se ha reportado en las formas esporádicas, familiares y adquiridas de las enfermedades priónicas, los filamentos helicoidales apareados (FHAs) han sido descritos en las formas genéticas raras como el GSS en áreas neocorticales (Tranchant et al., 1997) y en tálamo en el IFF (Jansen et al., 2011), por otro lado las marañas neurofibrilares (MNFs) se han encontrado en corteza frontal e hipocampo en la ECJ familiar (Jayadev et al., 2011).

En las prionopatías humanas las MNFs y los FHA son inmunoreactivos para múltiples anticuerpos contra tau, por otro lado las placas neuríticas son negativas para los anticuerpos

contra el péptido A $\beta$ , pero positivas para la PrP<sup>Sc</sup> (Sikorska, Liberski, Sobów, Budka, & Ironside, 2009). En la EA las neuritas distroficadas están asociadas a las placas de A $\beta$ , en las enfermedades priónicas las neuritas distroficadas se asocian a las placas de prión (Fig. 3). La proteína tau hiperfosforilada también se ha detectado en neuronas y células gliales de ratones transgénicos infectados con EEB (Bautista et al., 2006).

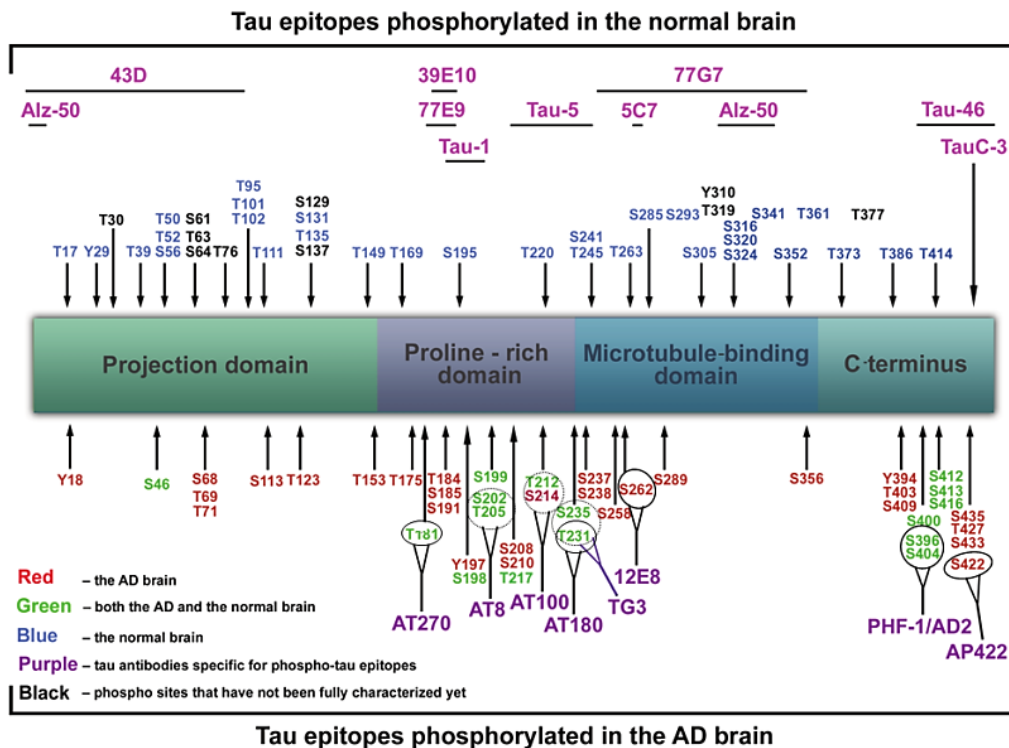


**Figura 3.- Inmunoreactividad del anticuerpo AT8 (Fosfo-PHF-tau Ser202/Thr205) y su asociación a las placas de la PrP<sup>Sc</sup> en EETs humanas.** Las flechas señalan las placas de proteína priónica. A) Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; B) Creutzfeldt-Jakob esporádico; C) Gerstmann-Sträussler-Scheinker; D) Kuru. (Adaptado de Sikorska et al., 2009).

## 2.7 Proteína tau en la Enfermedad de Alzheimer

Las taupatías son un grupo de trastornos neurodegenerativos esporádicos o familiares caracterizados por acumulaciones filamentosas de proteína tau hiperfosforilada en neuronas y células gliales, la degeneración neurofibrilar de tau se observa en enfermedades tales como el Alzheimer, demencia fronto-temporal, enfermedad de Pick, degeneración cortico-basal, demencia pugilística y parálisis supranuclear progresiva, entre otras (Arendt, Stieler, &

Holzer, 2016; Gozes, 2010). La enfermedad de Alzheimer es la taupatía mejor estudiada de entre las otras y su principal diferencia es que la acumulación de la tau patológica solo se observa en neuronas (Arendt et al., 2016; Braak & Braak, 1991). La EA se caracteriza clínicamente por un declive progresivo de las funciones cognitivas así como pérdida de la memoria a corto plazo. Los síntomas iniciales incluyen problemas con el lenguaje, desorientación espacio-temporal, cambios de humor, pérdida de la motivación, falta de autocuidado y problemas de conducta. A medida que disminuye la condición cognitiva de la persona, se vuelven retraídos con la familia y la sociedad. En última instancia las funciones corporales se pierden, lo que conduce a la muerte del paciente ~10 años después del diagnóstico (Alzheimer's Association, 2015).

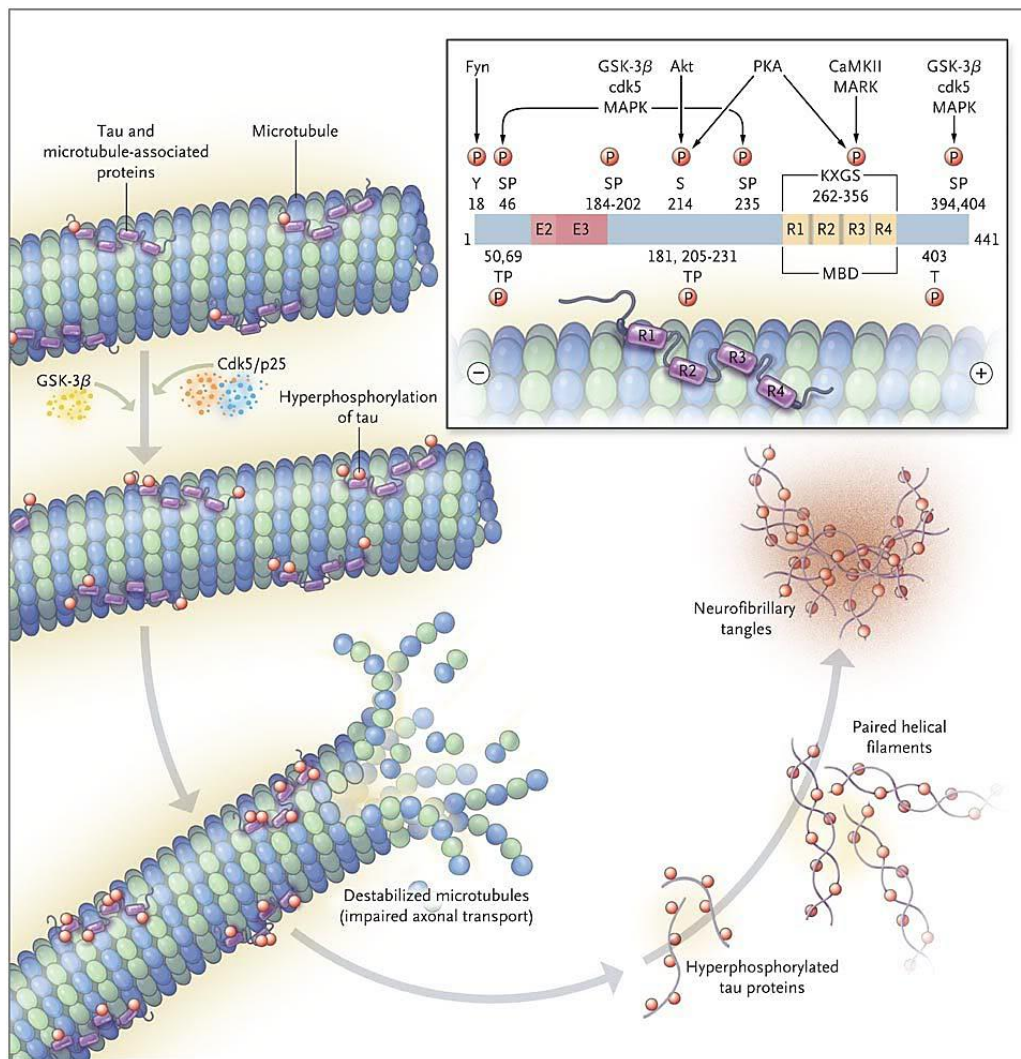


**Figura 4.- Sitios de fosforilación de la proteína tau y epítipes específicos de los anticuerpos más usados para su estudio.** (Tomado de Šimić et al., 2016).

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afectan regiones específicas en particular: el área entorrinal-hipocampo y neocorteza: las marañas neurofibrilares (MNFs) y las placas neuríticas son lesiones histopatológicas que caracterizan a esta enfermedad (Šimić et al., 2016). Las MNFs son agregados intracelulares de la proteína tau postraduccionalmente modificada (Fig. 4). Las placas neuríticas son extracelulares y están

compuestas principalmente de depósitos del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) (Luna-Muñoz, Zamudio, De la Cruz, Minjarez-Vega, & Mena, 2012).

Las MNF están constituidas por la acumulación masiva de filamento helicoidales apareados (FHA) siendo la proteína tau su principal constituyente la cual sufre modificaciones postraduccionales (hiperfosforilación y truncación) (Fig. 5). La proteína Tau se genera por el gen MAPT (Del inglés, *Microtubule-associated protein tau*) y se localiza predominantemente en los axones.



**Figura 5.- Mecanismos de fosforilación, ensamble y formación de las marañas neurofibrilares.** E2 y E3: sitios de splicing alternativo que generan las seis isoformas distintas de tau en el adulto. R1-R4: Dominios repetidos de unión a microtubulos (MBD, Microtubule-Binding Domain) (Tomado de la página web, <http://flipper.diff.org/app/items/info/5017>).

Se ha propuesto un patrón de agregación de la proteína tau durante la formación de las MNFs; se pueden definir cuatro estadios: 1) pre-maraña neurofibrilar (pre-MNF); 2) estado neurofibrilar temprano (marañas pequeñas); 3) marañas neurofibrilares intracelulares (MNFi) y 4) marañas neurofibrilares extracelulares (MNFe) (Luna-Muñoz et al., 2012).

El empalme alternativo, da origen a seis isoformas las cuales varían en longitud en el cerebro adulto, comprendidas en un intervalo de peso molecular aparente de 55 a 70 kDa, y se distinguen por su número de dominios de unión a microtúbulos en el extremo carboxilo terminal. Tres isoformas tienen tres dominios de unión (R1, R2, R3) y los otros tres tienen cuatro dominios de unión R1, R2, R3, R4 (Fig. 5, superior derecha). Típicamente las isoformas cortas (3R) están modulando la plasticidad axonal, mientras que las isoformas largas (4R) parecen estar más relacionadas con la estabilización de los microtúbulos (Šimić et al., 2016). Después de la traducción, la proteína tau puede ser modificada adicionalmente por fosforilación en varios sitios diferentes por varias cinasas que incluyen a la PKA y a la GSK-3 $\beta$  (Fig. 5, superior derecha).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de las enfermedades neurodegenerativas ha estado circunscrito durante muchos años a sus aspectos clínicos, que son derivados de procesamientos postraduccionales de ciertas proteínas que en última instancia dificultan las funciones neuronales normales. Aunque las taupatías y las enfermedades producidas por priones difieren en términos de incidencia y duración, ambos procesos muestran ocurrencia esporádica en la mayoría de los casos y signos neurológicos tempranos manifestados con anomalías cognitivas y pérdida de la memoria, siendo el Alzheimer y la ECJ las más importantes en cada caso.

En diversos estudios se han descrito las características patológicas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo las MNFs, en hipocampo y corteza de personas con enfermedad priónica del tipo familiar y en modelos murinos experimentales demostrando que las acumulaciones de tau hiperfosforilada son similares a la EA. Las similitudes clínicas iniciales entre estas enfermedades sugieren que se encuentra afectado el hipocampo, por lo que los cambios en la proteína tau podrían ser los determinantes importantes en las primeras etapas de la ECJ. En este contexto los antecedentes enfatizan la participación de la expresión de tau hiperfosforilada en la patogénesis de las EETs, y su probable vínculo con la proteína priónica.

Por lo anterior, en este proyecto se plantea analizar los cambios postraduccionales de la proteína tau en el hipocampo de personas que padecieron la EJC para describir las similitudes clínicas y patológicas entre la EA y la ECJ. Por otro lado, para abarcar todo el espectro clínico de la ECJ, también se tomarán en cuenta las etapas tardías de la enfermedad analizando el cerebelo y a que es el lugar donde es más evidente el daño progresivo incipiente.

## **4. HIPÓTESIS**

Si el deterioro cognitivo y la pérdida progresiva de la memoria son una característica común entre la EA y las enfermedades producidas por priones, entonces los cambios postraduccionales de la proteína tau en el hipocampo podrían estar involucrados en la pérdida de memoria acelerada en la enfermedad Creutzfeldt-Jakob.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión de la PrP<sup>Sc</sup> y su relación con el procesamiento patológico de la proteína tau en hipocampo y cerebelo en la enfermedad de Creutzfeldt- Jakob.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

En tejido nervioso de casos con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

1. Se analizara la expresión de la proteína tau fosforilada en su porción N- y C-terminal.
2. Se analizara la expresión de la proteína tau truncada en el Asp421 y Glu-391.
3. Se analizara la expresión e integridad de los neurofilamentos y su relación con la expresión con la proteína tau ante la presencia de las placas prion en el cerebelo.



## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.1 Tejido cerebral

Se utilizará cortes del hipocampo y del cerebelo de pacientes mexicanos diagnosticados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suarez” con enfermedad por priones y resguardados en el Banco Nacional de Cerebros “Dr. Raúl Mena López” (LaNSE-CINVESTAV). Los encéfalos fijados por inmersión en una solución de formalina al 10% serán seccionados y suspendidos en sacarosa al 10%. Los cortes de 50  $\mu\text{m}$  del hipocampo, corteza entorrinal y del cerebelo serán conservados en paraformaldehído al 4% y guardados a 4°C para su tratamiento.

### 6.2 Casos clínicos

Caso	Sexo	Edad	Síntomas iniciales	Duración	Diagnostico
M57-15	Masculino	57 años	Alteraciones mentales y de la marcha de rápida progresión.	15 meses	ECJs
F65-08	Femenino	65 años	Ataxia progresiva para la marcha.	8 meses	ECJs
M76-15	Masculino	76 años	Síndrome demencial de rápida evolución con apraxia en la marcha	15 meses	ECJs
F33-10	Femenino	33 años	Alteraciones en la marcha y cuadro demencial progresivo.	10 meses	ECJs
F55-26	Femenino	55 años	Cefalea pulsátil seguida de episodios de olvido repentino.	26 meses	ECJf
F43-12	Femenino	43 años	Pérdida de memoria de rápida evolución	12 meses	ECJf
F47-72	Femenino	47 años	Neuropatía sensitiva y síndrome cerebeloso	72 meses	GSS

**El número clave de los casos corresponde con el sexo, edad y duración de la enfermedad.**

### 6.3 Anticuerpos

Las evaluaciones histológicas incluyeron inmunotinciones por peroxidasa teñida con hematoxilina-eosina (H & E) y fluorescencias con anticuerpos contra la PrP y la proteína tau.

Anticuerpo	Epitopo	Casa comercial
3F4	aa109-112 de la PrP <sup>C</sup> y la PrP <sup>Sc</sup>	BioLegend
pT231	Fosfo-Thr231	Thermo Scientific
pT396	Fosfo-Ser396	Thermo Scientific
pT416	Fosfo-Ser416	abcam
pT422	Fosfo-Ser422	GeneTex
CP13	Fosfo-Ser202	
TG3	Cambio conformacional regional con fosforilación en los aa 231 y 235.	
PHF-1	Fosfo-396/404. Filamentos helicoidales apareados.	Thermo Scientific
Tau-C3	Fragmento truncado de Tau en Asp421	
423	Truncación en el Glu391	
Neurofilamentos	Detecta filamentos	abcam
GFAP	Astroglía reactiva	GeneTex
MMP-9	Metaloproteasa 9 activa	Thermo Scientific
ssDNA F7-26	Células en apoptosis	Chemicon

**Tabla 4.- Anticuerpos utilizados en este estudio.**

### 6.4 Inmunofluorescencia

Para el realizar la inmunodetección la tinción se realizara por flotación. Se realizara una reactivación de epítopes con buffer de citratos y se bloqueara la autofluorescencia con Negro Sudan por 10 minutos, se realizara un bloqueo con solución de albúmina libre de IgG (0.2%) en PBS (Sigma-Aldrich Co) por 20 min a Ta. Posteriormente se incubaran con el anticuerpo primario diluido en PBS-TritónX-100 al 0.2% (Sigma-Aldrich Co.), toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios se revelaron con el anticuerpo adecuado acoplado a diferentes fluorocromos, Dylight®-488 (Vector Laboratories) e isotiocianato de rodamina-TRITC (Jackson ImunoResearch). Las secciones serán contrateñidas con TO-

PRO®-3 (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se montarán con Vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes fluorescentes se capturarán utilizando un microscopio confocal TCS-SP8 (Leica, Heidelberg, Alemania) usando los objetivos 20x, 40x y 100x empleando de 10-15 cortes ópticos, con una distancia entre 0.8 -1.0  $\mu\text{M}$ .

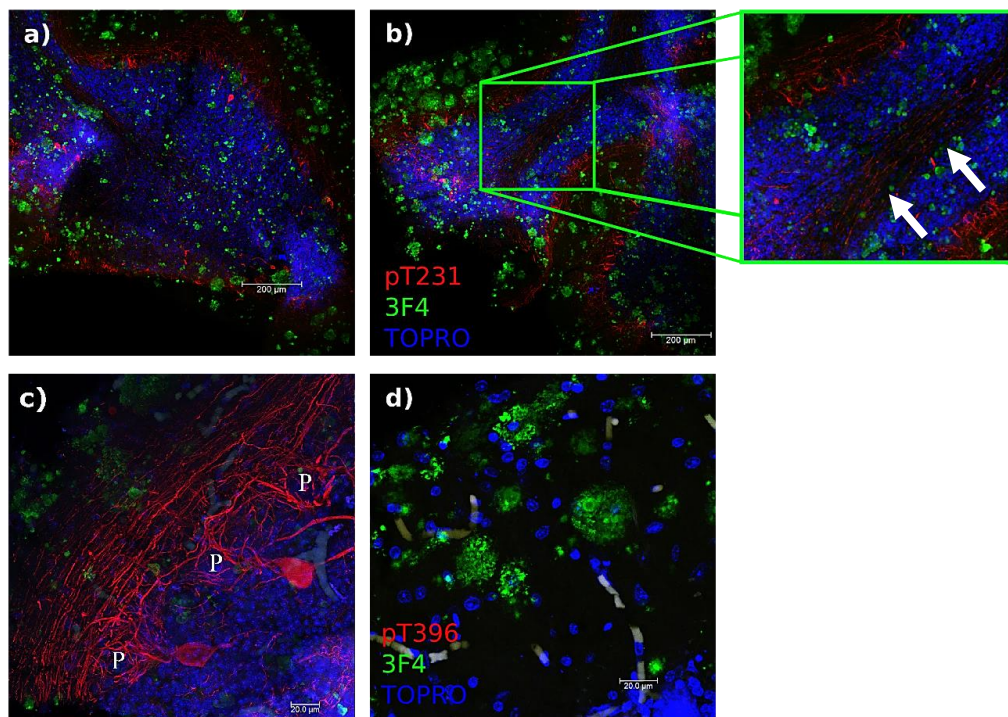
### **6.5 Inmunohistoquímica**

Para la tinción con peroxidasa los cortes conservados en paraformaldehído al 4% fueron pretratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.3% en PBS) durante 10 min para bloquear la peroxidasa endógena y se bloqueó los sitios inespecíficos con una solución de albumina libre de IgG (0.2% en PBS). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS-TritónX-100 al 0.2% (Sigma-Aldrich Co.), toda la noche a 4°C. La inmunoreacción fue observada con el sistema HRP (Horseradish Peroxidase) para las inmunoglobulinas de conejo y ratón (Jackson Research) y se utilizó 3-3-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Las preparaciones fueron contrateñidas con el método de H&E.

## 7. RESULTADOS

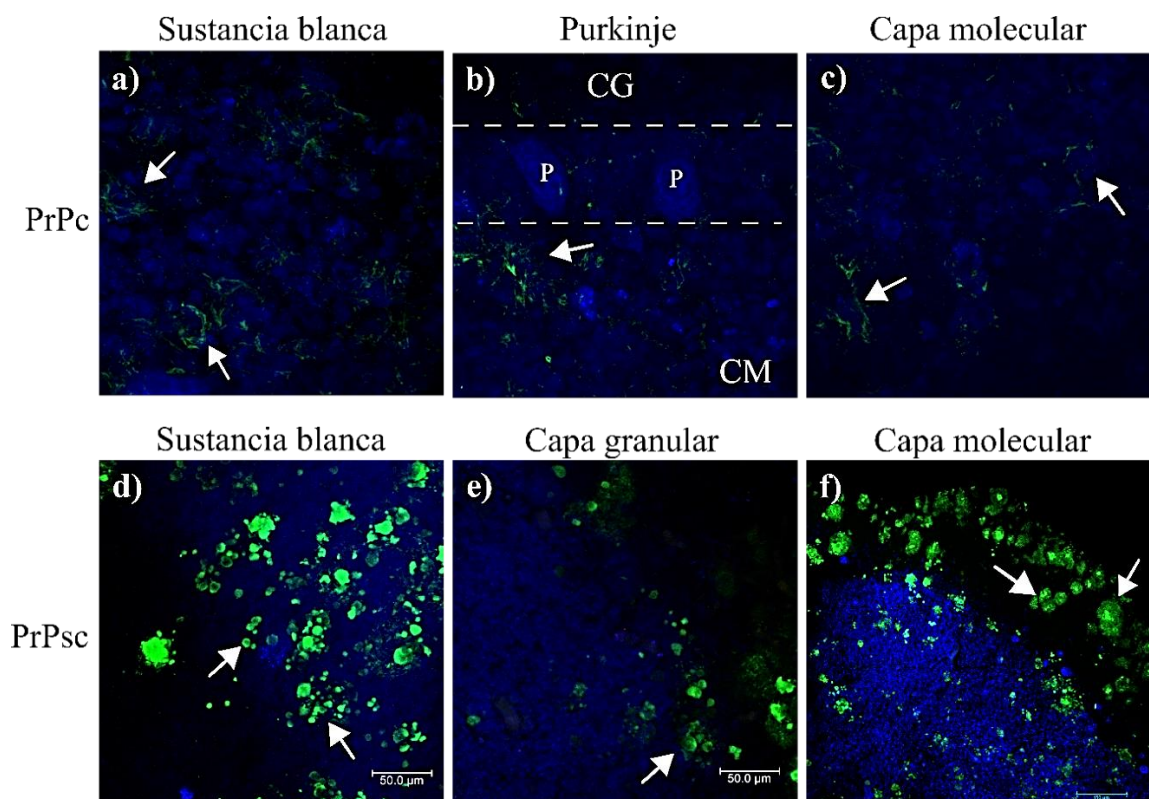
### 7.1 Expresión de la PrP<sup>Sc</sup> en el cerebelo

El diagnóstico confirmatorio de prión fue realizado con el anticuerpo 3F4 el cual muestra una abundancia de inmunoreactividad en el cerebelo de todos los casos utilizados. El análisis de la expresión de las placas de PrP<sup>Sc</sup> muestra una distribución abundante de las placas de prion en la capa molecular. Las placas marcadas con el anticuerpo 3F4 parecen tener una distribución uniforme tanto en las folias más externas (Fig. 6-a) como en las folias más internas y cercanas a los núcleos profundos (Fig. 6-b). El tamaño y proporción de las placas PrP<sup>Sc</sup> también es significativo, demostrando que en la capa molecular existe mayor expresión de la PrP<sup>C</sup> y por lo tanto es mayor la cantidad de PrP<sup>C</sup> con la que la PrP<sup>Sc</sup> puede interactuar. Se puede observar la integridad en las fibras paralelas (Fig. 6-c) marcadas con el anticuerpo pT231.



**Figura 6.- Expresión de la PrP<sup>Sc</sup> en el cerebelo con GSS.** En a) y b) se observa la expresión del anticuerpo pT231 (rojo) que reconoce la fosforilación de Thr231 de Tau en una folia externa e interna respectivamente, y se observan agregados de la PrP<sup>Sc</sup> (verde); en azul se evidencian los núcleos. c) Fibras paralelas en la capa molecular. d) no se observa reactividad con el anticuerpo pT396. En el acercamiento de la figura b se señalan los axones de las células de Purkinje marcados con el anticuerpo pT231. P: Purkinje.

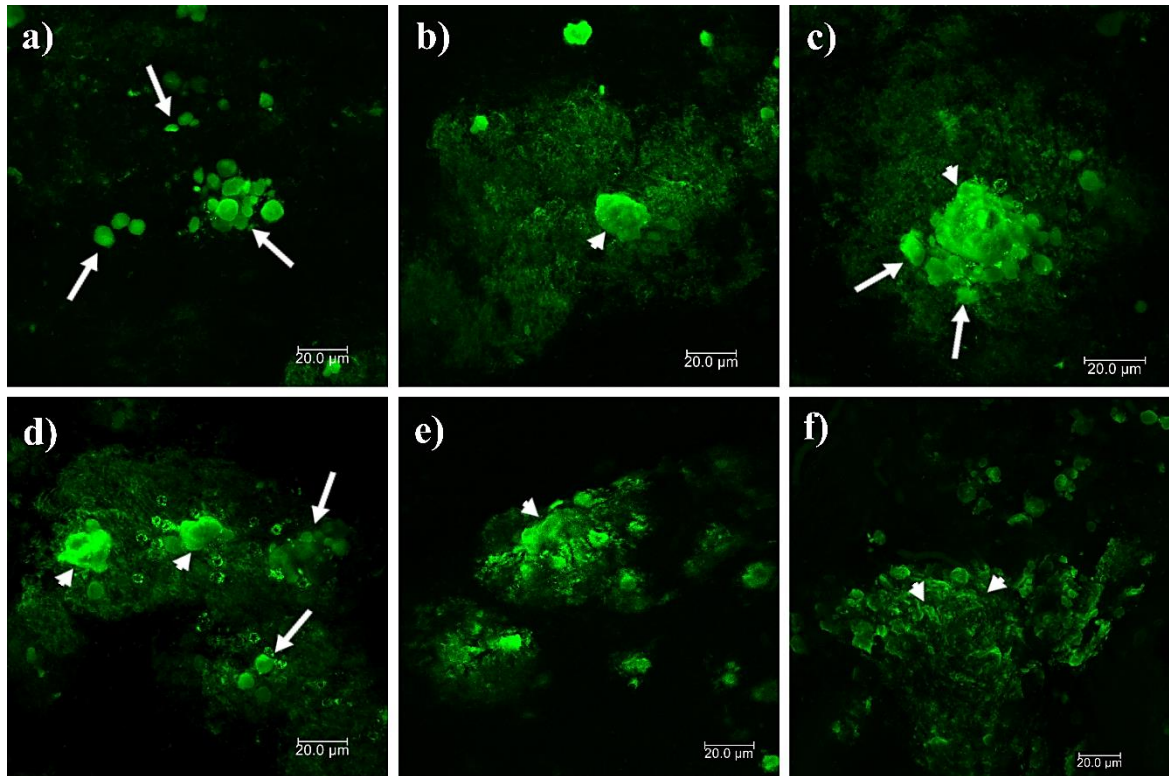
El patrón de expresión de la PrP<sup>C</sup> en la sustancia blanca en la Fig. 7-a (Flechas) y en la capa molecular en la Fig. 7-c (Flechas) denotan que los agregados de la PrP<sup>Sc</sup> en el cerebelo se originan de la PrP<sup>C</sup> expresada en lo que pueden ser los astrocitos de la sustancia blanca y del neuropilo de las capas granular y molecular. En las células de ambas capas se puede observar que la inmunoreactividad con el anticuerpo 3F4 se localiza en el citoplasma (Flechas, Fig. 7-a, b, c). Por otro lado, en la sustancia blanca no se observan placas de prion, las estructuras observadas corresponden a agregaciones celulares más parecidas a pequeños grumos y gránulos (Aumento de la Fig. 6-b y Fig. 7-d, e) de células residuales de aproximadamente 5-10  $\mu\text{m}$  de longitud, sugiriendo que estos gránulos pueden ser los núcleos mínimos que finalmente forman las placas de prion en la capa molecular (Fig. 7-f).



**Figura 7. Expresión de la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> en el cerebelo.** La reactividad del anticuerpo 3F4 muestra la localización citoplasmática de la PrP<sup>C</sup> en la sustancia blanca y en la CM a), b) y c). Los agregados de PrP<sup>Sc</sup> parecen aumentar en tamaño y densidad de la sustancia blanca a la CM. CG: Capa granular. CM: Capa molecular. P: Células de Purkinje.

Una magnificación de las áreas del cerebelo en las que se observan los agregados y las placas señaladas en las figura 7 (d, e, f), muestra un patrón que se repite en todos los casos estudiados. El patrón observado en la figura 8 parece corresponder con diferentes estadios

de agregación de la partícula priónica, apuntando a que la replicación inicia en la sustancia blanca y que los agregados (Fig. 8-a) se atraen entre si induciendo tanto la conversión de la PrP<sup>C</sup> en la PrP<sup>Sc</sup> como su acumulación en los agregados densos que van aumentando de tamaño hasta generar las placas insolubles en la capa molecular del cerebelo (Fig. 8-e, f).

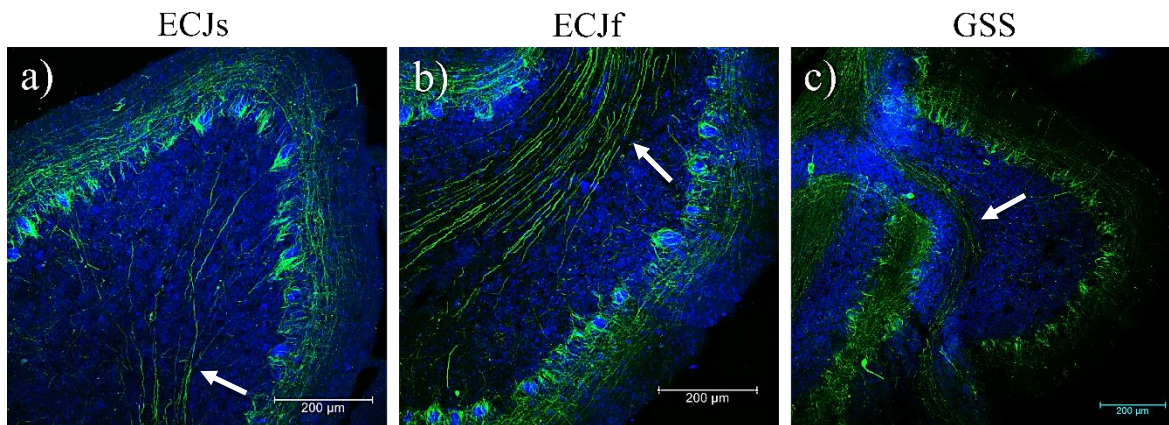


**Figura 8. Exploración por microscopia confocal de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en las diferentes capas del cerebelo.** La inmunofluorescencia se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-PrP 3F4. Las puntas de flecha muestran placas prominentes de PrP<sup>Sc</sup> y las flechas muestran los agregados celulares. (a) En la sustancia blanca se observan agregados de 5 - 10 μm de diámetro. (b) Conforme avanzamos hacia la CG las aglomeraciones de la PrP<sup>Sc</sup> se tornan más densas y parecen atraer a otros agregados (c). (d, e) Los agregados densos interaccionan con otros agregados y parecen dar lugar a las placas de prión mayores a las 50 μm observadas en la CM (f). CG: capa granular. CM: capa molecular.

## 7.2 Hiperfosforilación de Tau en cerebelo

Con el anticuerpo pT231 se observó que los axones y dendritas de las células de Purkinje se encuentran íntegros, por lo que la respuesta neurotóxica producidas por las placas de prión cercanas a las fibras paralelas que regulan a las células en cesta, a las células estrelladas y a las propias células de Purkinje no interrumpe su actividad excitatoria sobre estas, pero si aumenta la expresión de la fosforilación en la Thr231 de tau, por lo que la

respuesta de esta fosforilación puede ser una señal neuroprotectora de los neurotúbulos en respuesta al ambiente neurotóxico producido por las placas de prión localizadas en la capa molecular (Fig. 6-a, b) y al colapso de la citoarquitectura en la sustancia blanca por la conversión de la PrP<sup>C</sup> en la PrP<sup>Sc</sup> en la sustancia blanca (Fig. 7-a). El anticuerpo pTau396 que detecta la fosforilación en la Ser396 no mostro reactividad (Fig. 6-d). De la misma forma ningún otro anticuerpo empleado en este estudio contra los cambios postraduccionales de la proteína tau mostró inmunoreactividad en el cerebelo.

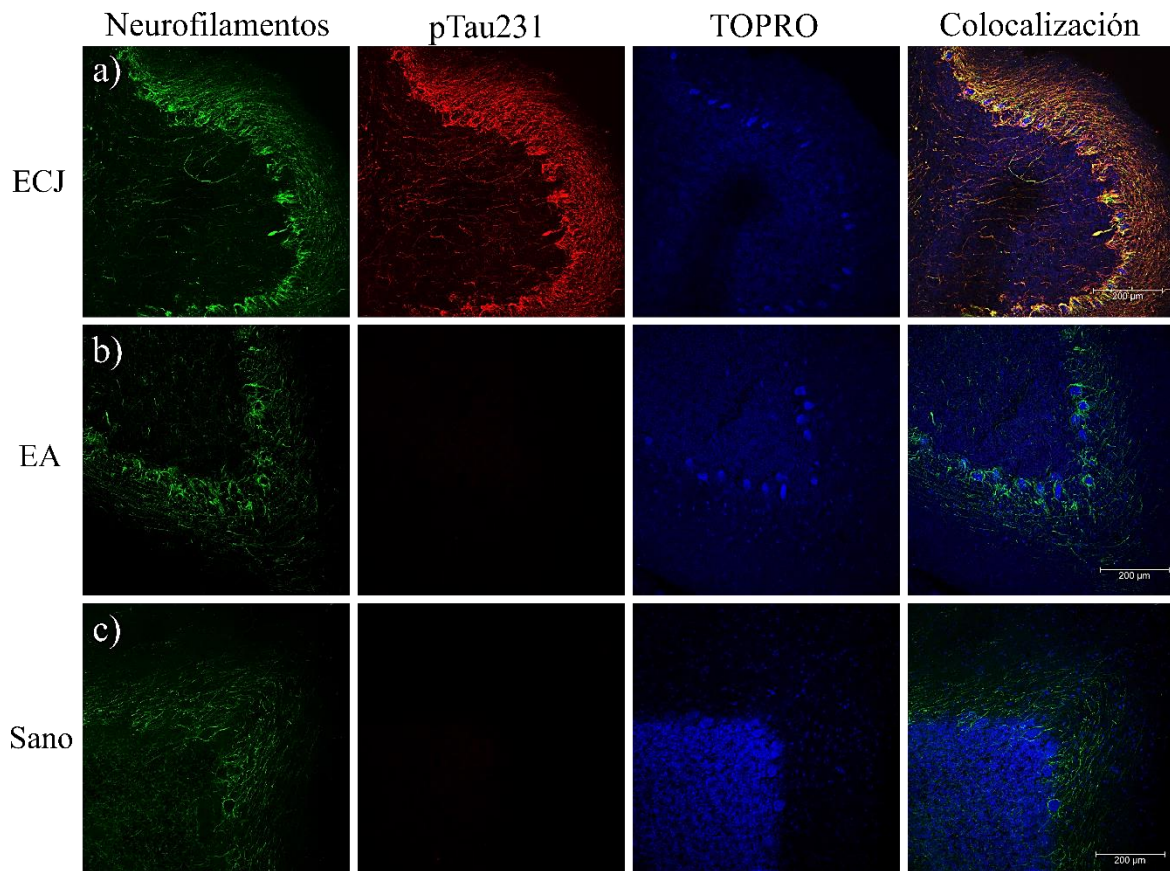


**Figura 9.- Patrones de inmunoreactividad similares con el anticuerpo pT231 en el cerebelo en EETs familiares y esporádicas.** Presencia de reacción positiva (verde) en los axones de las de células de Purkinje y las proyecciones de las fibras paralelas provenientes de las células granulares.

Sin importar la duración de la enfermedad, tanto en los pacientes con ECJ como en el GSS la expresión de tau es similar para los casos estudiados (Fig. 9-a, b y c), puede observarse que la fosforilación en la Thr231 está manteniendo la integridad de los neurotúbulos. Los niveles de expresión de Tau fosforilada en la Thr231, indican que en las EETs el ambiente neurotóxico producido por las placas y los agregados de la PrP<sup>Sc</sup> eleva los niveles de expresión de tau, y que la fosforilación en la Thr231 es una respuesta neuroprotectora a la neurodegeneración causada por el colapso de la citoarquitectura neuronal producido por la pérdida de los astrocitos en la sustancia blanca, apoyando la idea de que estas acumulaciones de tau no contribuyen en las características clínico-patológicas en etapas terminales de la ECJ.

Para demostrar la hipótesis de que la fosforilación de tau en la Thr231 es una respuesta neuroprotectora al ambiente producido por la partícula priónica se analizó y comparó la expresión de los neurofilamentos en los casos de enfermedad por priones, en casos con

Alzheimer y en casos sin demencia (Fig 10). El evento de fosforilación en la Thr231 y la sobreexpresión de los neurofilamentos parecen estar modulando la organización del citoesqueleto axonal en respuesta al daño producido por la presencia del prión (Colocalización Fig. 10-a). El patrón complejo de fosforilación en tau y su relación con el ambiente producido por el prión aún es desconocido.



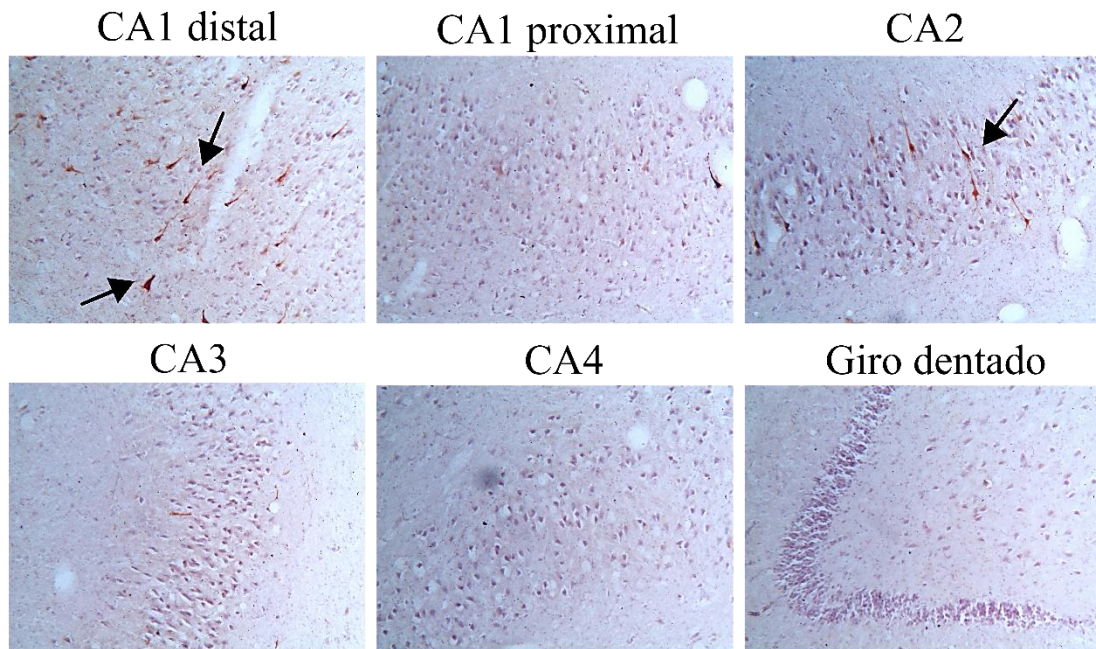
**Figura 10.- Presencia de neurofilamentos en los casos de enfermedad por priones.** (a) En las enfermedades por priones se encuentra aumentada la expresión de los NFs y colocaliza con la tau fosforilada en la Thr231. (b, c) En la EA y los cerebros sin demencia la expresión de los NFs es similar entre estos casos, mientras que el anticuerpo pTau231 no exhibe ninguna marca. Las secciones fueron contrastadas con TOPRO como control de fondo ECJ: Enfermedad de Creutzfeld-Jakob. NFs: Neurofilamentos. EA: Enfermedad de Alzheimer.

### 7.3 Hiperfosforilación de tau en hipocampo

En los pacientes con EA se ha empleado el anticuerpo pT231 como un marcador neuropatológico específico de las marañas neurofibrilares y de las placas neuríticas, su expresión es localizada en todos los estratos de la formación hipocampal (Luna-Muñoz et al., 2012). Sin embargo, el análisis de los hipocampos de los casos con ECJ revela que su



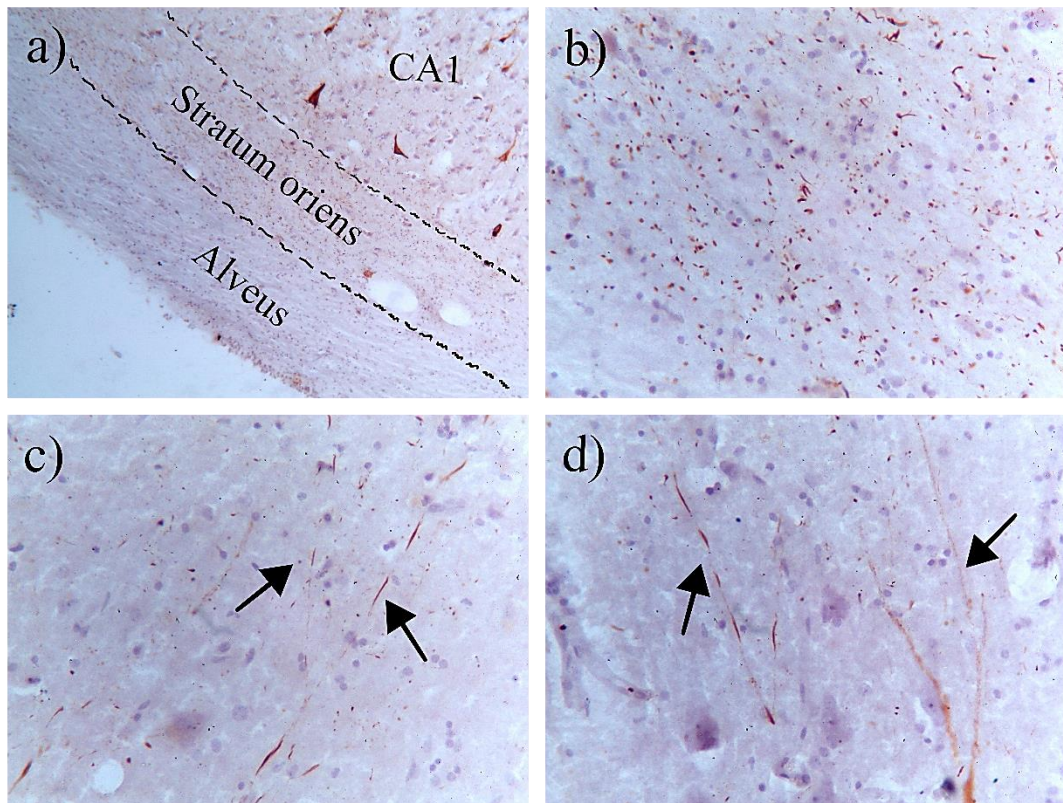
expresión se limita a la región CA1 (Fig. 11) y el stratum oriens (Fig. 13-b), aunque también se observa una reactividad menos pronunciada en la región CA2 (Fig. 11).



**Figura 11.- Inmunoreactividad del anticuerpo pT231 en hipocampo.** La presencia de reacción positiva en las neuronas piramidales de la capa CA1 próxima al subiculum y en neuronas de la capa CA2 revela la presencia de premarañas y una menor cantidad de MNFs. Obsérvese que otras regiones del hipocampo no muestran presencia de premarañas.

A diferencia de los casos con EA, los casos con ECJ muestran muy pocas marañas neurofibrilares y las placas neuríticas están ausentes, por otro lado la expresión de tau es localizada solo en la region de CA1 próxima al subiculum (Fig. 11), demostrando que en esta patología el procesamiento de tau es distinto al procesamiento típico de tau documentado en la EA por Brack y Brack en 1991.

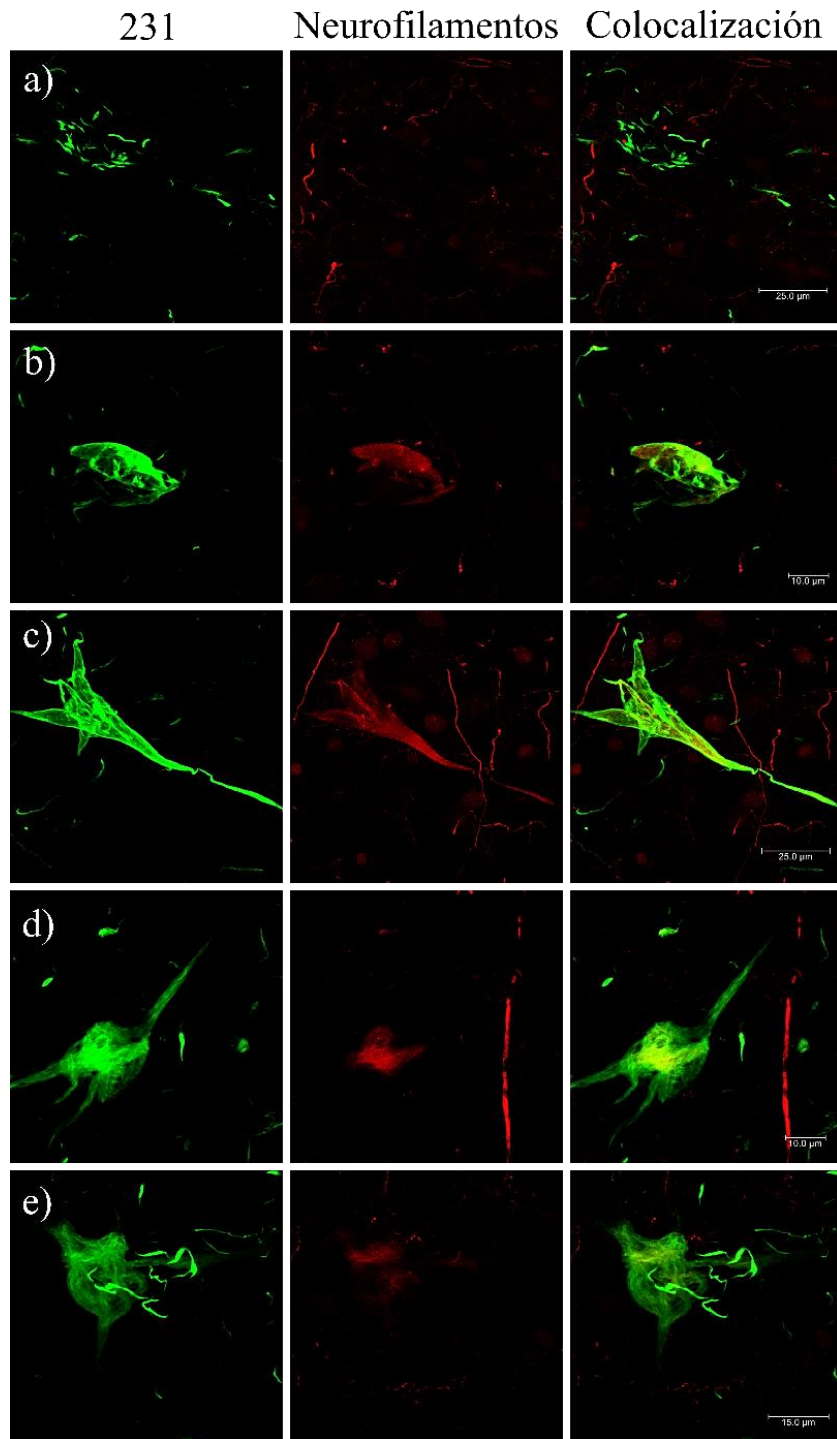
Al igual que ocurre en el cerebelo de estos mismos casos se observaron gran cantidad terminales sinápticas (Fig. 12-b) y dendritas apicales(Fig. 12-c, d), indicando que esta fosforilación podría desencadenar una señal neuroprotectora en respuesta al producto patogénico producido por el prión o en respuesta al daño por las vacuolizaciones en el subiculum. En el subiculum se encuentran la mayor cantidad de lesiones vacuolares correspondiendo con lo documentado por Kaneco y colaboradores en el 2008.



**Figura 12.- Inmunorreactividad de pTau231 en el *stratum oriens* y en las dendritas de las células piramidales.** a) Representación de las tres capas externas de la formación hipocampal. b) Reactividad del anticuerpo en el *stratum oriens* sobre CA1. c) Dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA1 y de CA2 en d) proyectando hacia el *stratum radiatum* y *lacunosum-moleculare*.

Las imágenes de inmunofluorescencia en el hipocampo con el anticuerpo pTau231 y NFs tienen marcadas diferencias con lo que ocurre en el cerebelo. Las estructuras reconocidas por estos anticuerpos mostraron una elevada inmunorreactividad en premarañas (Pre-MNFs) e inclusiones intranuronales de tau, las cuales inician con una morfología fibrilar compacta (Fig. 13-a) que invade completamente el soma de la neurona (Fig. 13-c). Conforme avanza el estado de fosforilación en más moléculas de tau, estas dejan de cumplir su función protectora y comienza el evento de agregación con la subsecuente despolimerización del neurotúbulo (Fig. 13-d, e). La sobreexpresión de los NFs pone de manifiesto la relación de tau y la neuroprotección, conforme tau se fosforila también aumentan los NFs indicando la interacción neurotúbulo/neurofilamento (Fig. 13-b, c). Esta interacción disminuye en estadios más tardíos cuando tau pierde su función neuroprotectora (Fig. 13-e). Se encontraron en mucha menor medida MNFs. Por otro lado, no hubo

evidencia de las neuritas distróficas ni de las agregaciones neuríticas en forma de placa características de la EA en los casos de prión analizados.

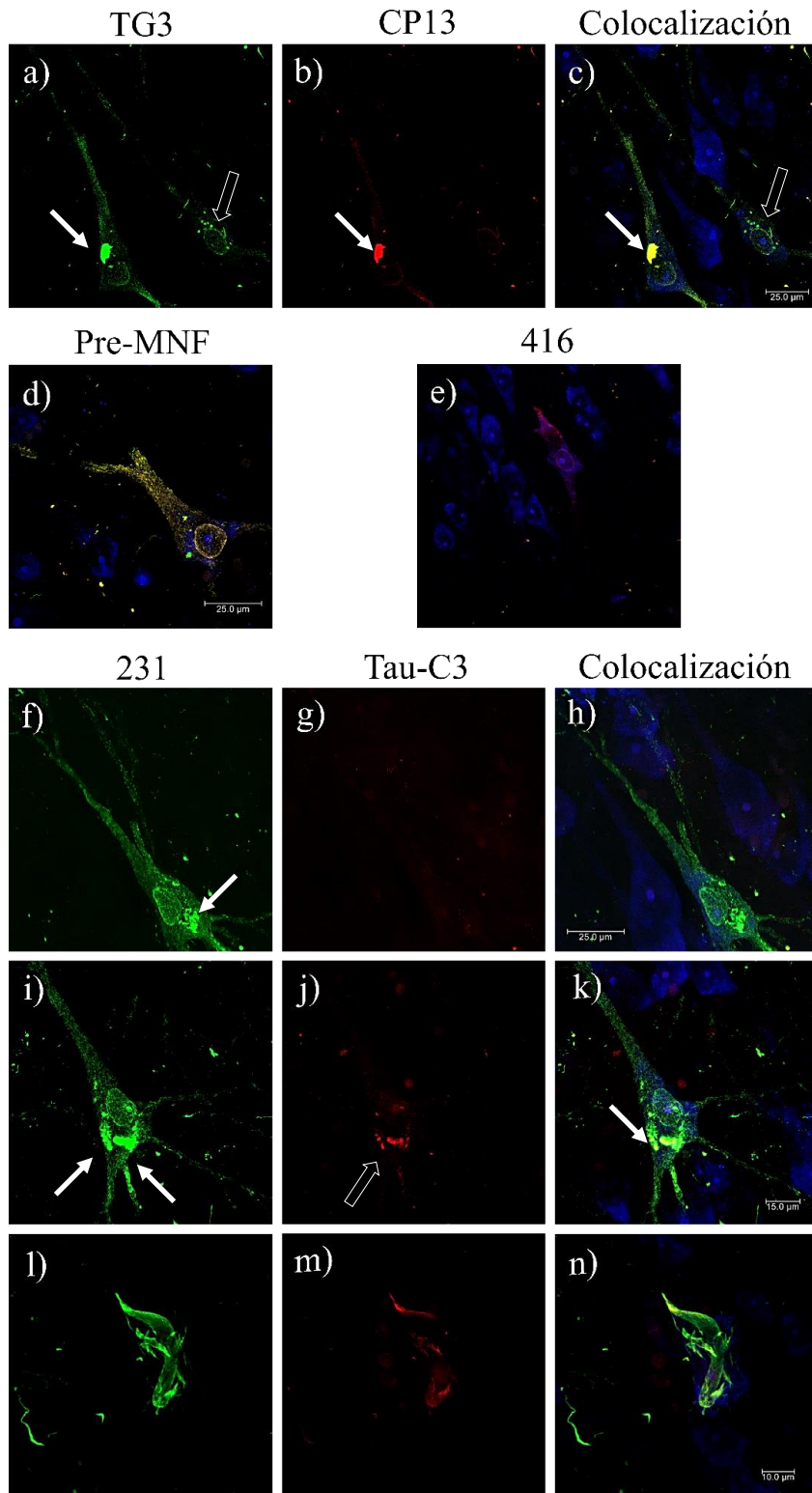


**Figura 13.- Secuencia de cambios citoesqueléticos en las neuronas piramidales de CA1.** (a) Inclusiones intraneuronales de tau fosforilada en paquetes densos (verde). (b) Acumulación de la tau en el soma de la neurona piramidal, los NFs comienzan a sobreexpresarse. (c) Pre-MNF y su colocalización con los NFs. (d, e) Marañas con densas agregaciones de tau, disminución de los NFs.

El patrón de agregación de la proteína tau se observó en las pre-MNF, las cuales se caracterizan por presentar una tinción granular difusa distribuida en el citoplasma neuronal (Fig 14). Esta tinción colocaliza con el anticuerpo CP13 y TG-3, lo que indica fosforilación y cambio conformacional en la proteína tau (Fig. 14-d). Adicionalmente se observó en las pre-MNF una tinción fuerte y densa en pequeños paquetes que se encontraban distribuidos en la vecindad del núcleo, estas estructuras fueron reconocidas por los anticuerpos TG-3 (Fig 14-a. Flechas) y CP13 (Fig. 14-b. Flechas). Estos paquetes pueden encontrarse presentes en dos formas, pequeños paquetes densos de proteína tau con cambio conformacional en su estructura (Fig. 14-a. Flechas con relleno) y paquetes grandes densos (Fig. 14-a, b. Flechas con relleno). Las imágenes de colocalización indican que la fosforilación en la Ser202 viene después de que ocurre el cambio conformacional evidenciado por el TG-3 (Fig 14-c, d. Flechas). La fosforilación en la Ser416 solo mostró marca en las pre-MNFs (Fig. 14-e).

Por otro lado, el análisis de la presencia de truncación temprana (Asp421, anticuerpo TauC3) y la truncación tardía (Glu391, anticuerpo 423) se realizó en conjunto con el anticuerpo pTau231 que aparece en todos los estadios de agregación de tau, desde pre-MNF a MNF, evidenciando los paquetes cercanos al núcleo (Fig. 14 f, i). La fosforilación en la Thr231 que logró observarse en la maraña neurofibrilar temprana corresponde al estadio dos de agregación de tau catalogados en la EA. Las pequeñas marañas pueden observarse con el anticuerpo pTau231, sin evidencia de la truncación el Asp421 (Fig 14-h).

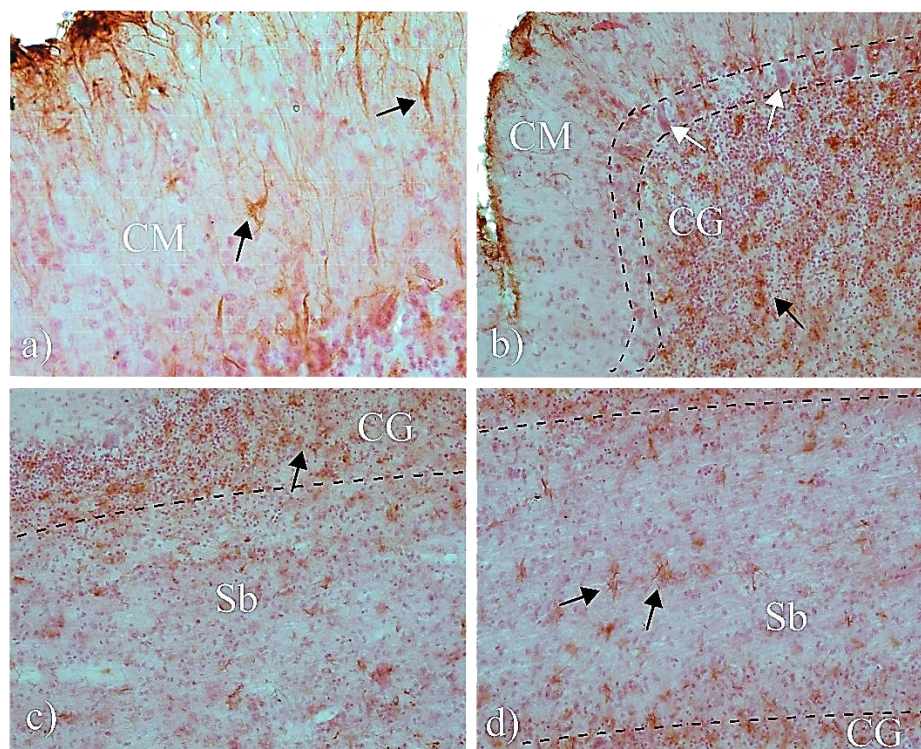
En algún momento durante el proceso de agregación de tau, esta es proteolizada dejando en evidencia el fragmento truncado en el Asp421 que se observa en la MNF temprana en colocalización con la fosforilación en la Thr231 en los paquetes densos (Fig. 14-i, j, k. Flechas). Estas marañas tempranas o “beeds” al parecer tienden a fusionarse y elongarse (Fig 14-i, j, k. Flechas), para dar paso a la MNF intracelular (MNF<sub>i</sub>) (Fig. 14-l, m, n). El anticuerpo 423 no mostró reactividad (Dato no mostrado) en estos cerebros.



**Figura 14.- Patrón de expresión de tau en la región CA1.** Presencia de las fosforilaciones en Thr231/Ser235 (a, TG3), Ser202 (b, CP13), Ser416 (e) y Thr231 (f, i, l) en las Pre-MNFs. Se observó la colocalización de las fosforilaciones en los “beads” y paquetes densos intracelulares. Truncación en el Asp421 (g, j, m) en los depósitos granulares perinucleares. Las flechas rellenas y sin relleno denotan los paquetes densos de tau y los “beads” respectivamente.

#### 7.4 Muerte celular en el cerebelo

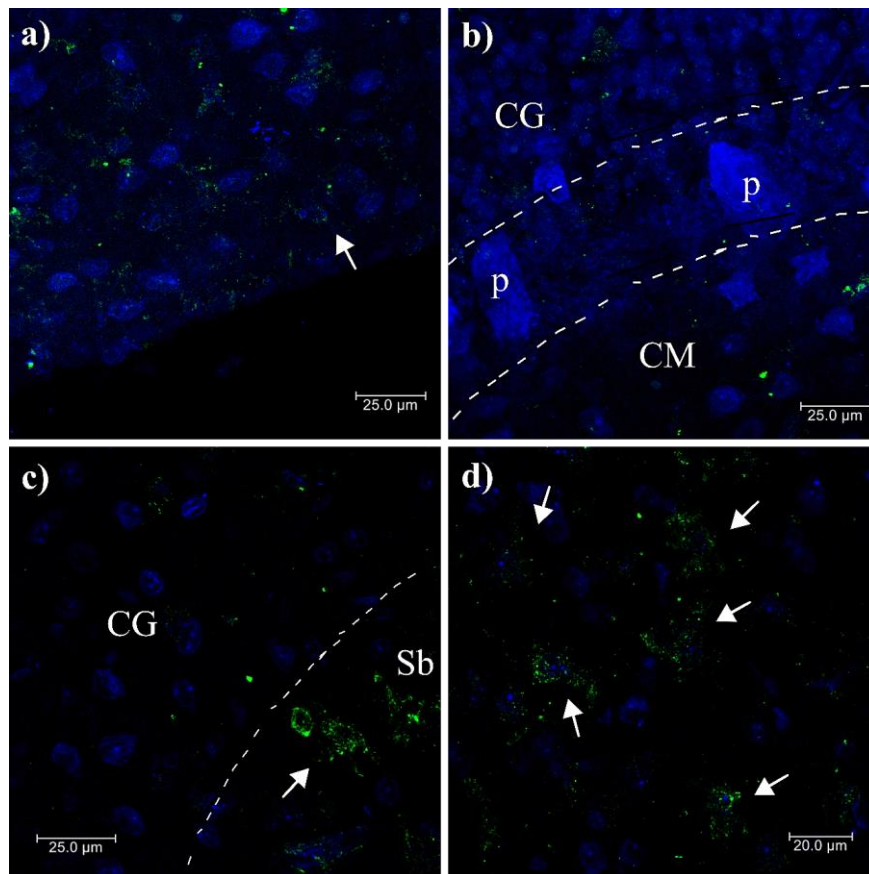
Para determinar el tipo de muerte neuronal y las células afectadas en los casos de enfermedad por priónes se analizó la expresión de astrocitos reactivos, metaloproteinasa-9 (MMP-9) y cuerpos apoptóticos. Los astrocitos reactivos pueden observarse en la capa molecular (Fig. 15-a. Flechas negras), la capa granular (Fig. 15-b, c. Flechas negras) y la sustancia blanca (fig. 15-d. Flechas). Aunque la astrogliosis está presente en todas las capas del cerebelo, la tinción para GFAP es más fuerte en la capa granular indicando daño, hipertrofia celular y destrucción de las neuronas próximas en esta región (Fig. 15-b, c. Flechas negras).



**Figura 15.- Astrogliosis en las capas del cerebelo de casos de enfermedad por priónes.** La inmunohistoquímica para GFAP reveló un patrón de expresión altamente variable en las diferentes capas celulares del cerebelo. De la CM a) a la CG (b, c) se observó un aumento dramático de astrocitos reactivos (Flechas negras). (d) En la Sb puede observarse astrocitosis. CM: Capa molecular. Las flechas blancas señalan a las neuronas de Purkinje. CG: Capa granular. Sb: sustancia blanca

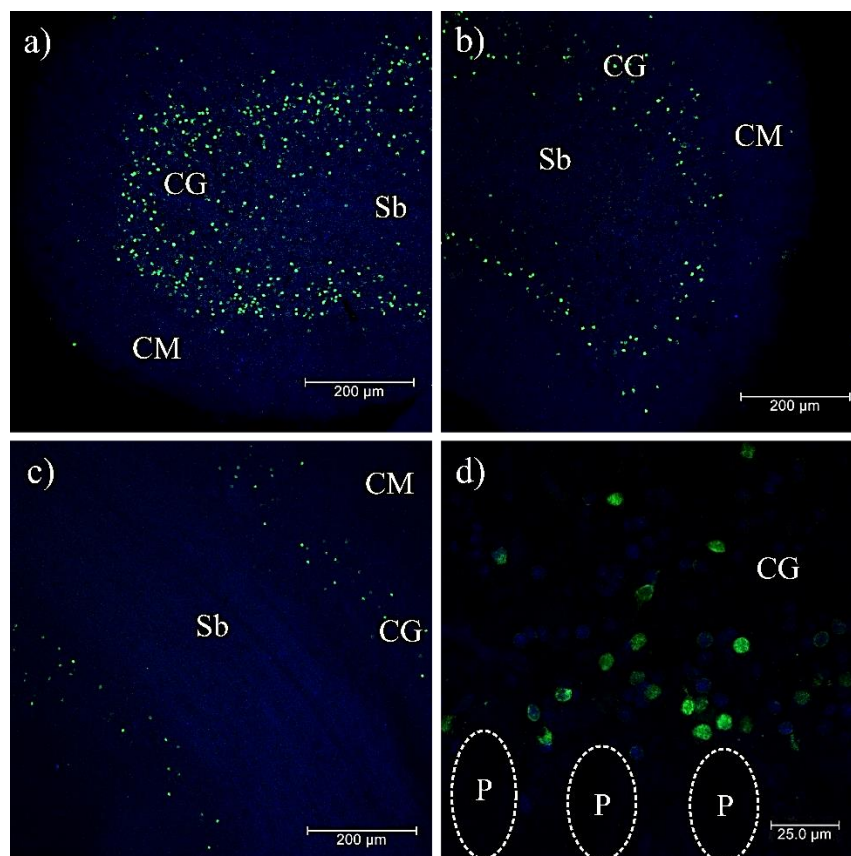
Por otro lado, la MMP-9 se ha encontrado altamente expresada en cerebros de pacientes con EA y se ha asociado a la muerte neuronal provocada por la presencia de las placas de A $\beta$ . La capa molecular (CM), que es la más externa contiene a las fibras paralelas que

recorren la capa cortical del cerebelo, así como a las proyecciones dendríticas de las células de Purkinje; interneuronas “células estrelladas (superficiales) y células en canasta (profundas)” que establecen sinapsis gabaérgica sobre las neuronas de Purkinje, y también hay neuroglia. En esta capa la expresión de la MMP-9 se ubica en estructuras que morfológicamente corresponde con estructuras gliales (Fig. 16-a). Hacia la capa de células de Purkinje la expresión no es evidente (Fig. 16-b). La capa granular está compuesta por las células granulares, células de Golgi tipo II, glomérulos cerebelosos y astrocitos protoplasmáticos. En esta capa la inmunoreactividad de la MMP-9 es menos marcada que en la CM (Fig. 16-b, c). Finalmente, en la sustancia blanca (Sb) es donde se observó abundante marca de reactividad indicando que la MMP-9 está siendo expresada por los astrocitos en respuesta a la agregación de la PrP<sup>Sc</sup> (Fig 16-d).



**Figura 16.- Expresión de la MMP-9 en las diferentes capas del cerebelo.** De la capa más externa hacia la sustancia blanca, en a) se observa abundante expresión de la MMP-9 (Flechas) en la capa molecular, la marca disminuye hacia la capa de células de Purkinje en b), en c) la expresión aumenta de la capa granular hacia la sustancia blanca. En d) se observa mayor expresión de MMP-9 en la sustancia blanca. Las líneas punteadas muestran el punto de intersección entre una capa neuronal y otra. P: Células de Purkinje. CM: Capa molecular. CG: Capa granular. Sb: sustancia blanca.

Para evidenciar el fenómeno de apoptosis en el cerebelo se empleó el anticuerpo ssDNA F7-26 (*Anti-single stranded DNA, Chemicon*) que se une al DNA nuclear fragmentado. Las células en apoptosis se encontraron mayormente distribuidos en la corteza cerebelosa, en donde su mayor presencia puede observarse en la capa granular (Fig. 17-a, b), hacia la capa molecular también se observa menor cantidad de reactividad (Fig. 17-a, b). En la sustancia blanca que es la región por donde corren las fibras intrínsecas que comunican los hemisferios cerebelosos, las aferentes provenientes de la medula espinal y la corteza cerebral; y la eferentes constituidas mayormente por los axones de las células de Purkinje, los cuerpos apoptóticos no son evidentes (Fig. 17-c). El patrón de distribución de los núcleos apoptóticos parece estar asociado a la actividad astrocítica aumentada evidenciada por el GFAP en la Fig. 15, indicando que las células que mueren en la infección por priónes son las células granulares (Fig. 17-d). Aparentemente las células de Purkinje no son afectadas.



**Figura 17.- Tinción de células apoptóticas en el cerebelo.** a) y b) Marcada inmunotinción de células en apoptosis (verde) en las folias cerebelo. c) No hay marca de reactividad en la Sb. d) Magnificación a 100x de la CG, se muestran los núcleos de las células granulares no dañadas (Azul) y las dañadas (Verde). P: Células de Purkinje. CM: Capa molecular. CG: Capa granular. Sb: sustancia blanca.



La localización de los pequeños agregados de PrP<sup>Sc</sup> (Fig. 8) y la expresión de MMP-9 (Fig. 16) en la sustancia blanca sugiere que la PrP<sup>C</sup> está siendo expresada por los astrocitos y que su conversión en PrP<sup>Sc</sup> genera un ambiente tóxico que afecta a las células granulares conduciendo a su muerte, la muerte de las células granulares dispara la expresión de astrocitos reactivos que alteran su función de protección en la recaptura de neurotransmisores lo que conlleva al colapso de la citoarquitectura axonal de las fibras aferentes correspondientes a las fibras musgosas (provenientes de los núcleos del puente y la medula espinal), trepadoras (corteza somatosensitiva y de la oliva inferior) y de los sistemas serotoninérgicos (Núcleos de Rafe) y noradrenérgicos (Locus ceruleus), así como de los axones de las células de Purkinje y de las células de proyección de los núcleos profundos. El colapso de la citoarquitectura podría deberse en mayor medida al ambiente citotóxico producido por la conversión de la PrP<sup>C</sup>.

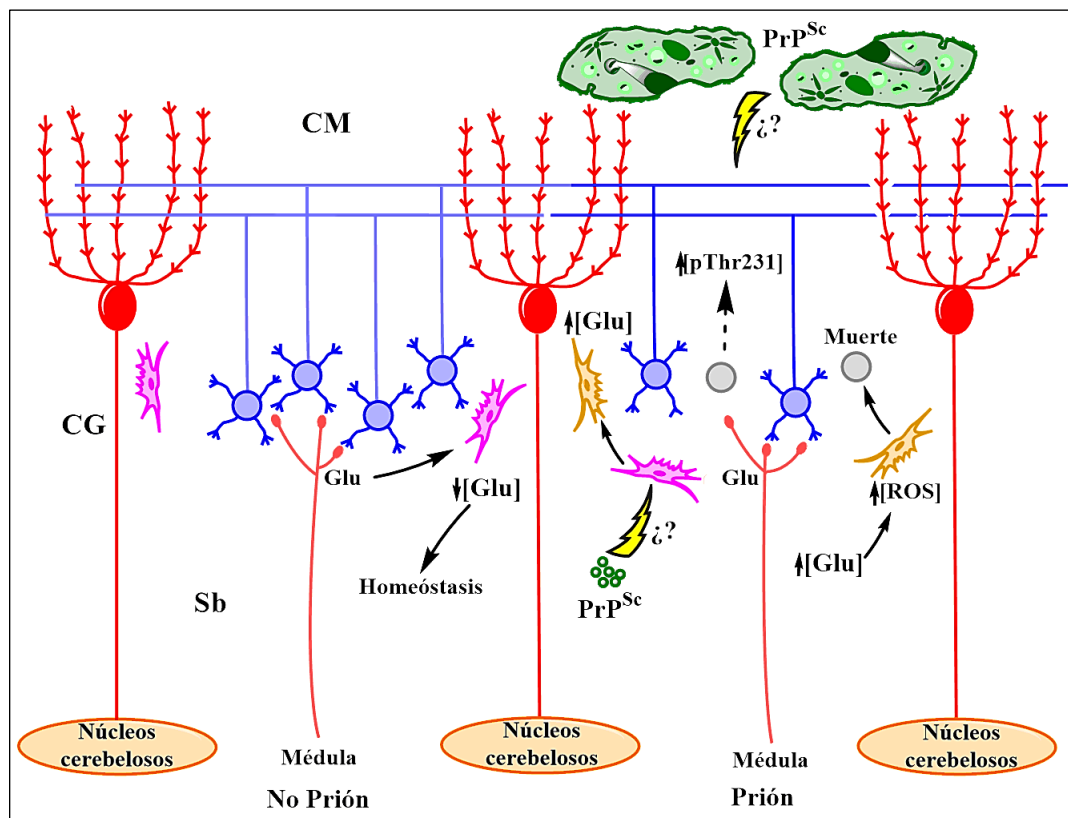
## 8. DISCUSIÓN

El mecanismo que inicia la conversión de la PrP<sup>C</sup> en la PrP<sup>Sc</sup> es desconocido, se ha sugerido que la alteración de la PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> puede tener lugar en el retículo endoplásmico, en donde las proteínas ya son anormales después de la síntesis, y que después son translocadas al citosol para su degradación en el proteosoma por la vía ERAD (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) (Béranger, Mangé, Goud, & Lehmann, 2002; Ma, Wollmann, & Lindquist, 2002), estos hechos son similares con lo observado en la figura 7-a, b, c; lo que sugiere que la presencia de la PrP<sup>C</sup> en el citoplasma es la que sufre el cambio conformacional a PrP<sup>Sc</sup> y que su agregación forma los agregados que se observan en la sustancia blanca del cerebelo (Fig. 7-d, e). Los agregados antes descritos, que difieren en magnitud, forman aglomeraciones las cuales parecen ser las que inician los eventos de agregación que finalmente forman las placas extracelulares de proteína prión observadas en la capa molecular (Fig. 6-c, d, Fig. 7-f y Fig.-8). De igual manera podemos inferir que las placas de prión no son las causantes de la replicación del agente, sino la PrP<sup>Sc</sup> libre que se evidencia por la tinción difusa en torno a los agregados (Fig. 8-b, c, d).

Estas observaciones podrían explicar que el origen de PrP<sup>Sc</sup> son los astrocitos, interneuronas y células granulares debido a que la inmunoreactividad del anticuerpo 3F4 parece estar localizada en las regiones donde estas células son más abundantes, estos resultados tienen relación con la actividad de los astrocitos en la toxicidad del L-glutamato en cultivos mixtos de astrocitos-PrPKO y WT, en donde los astrocitos-PrPKO ejercen influencia sobre la supervivencia neuronal en la regulación de la neurotransmisión glutamatérgica (Pathmajeyan et al., 2011). En nuestro caso, la trasmisión glutamatérgica que podrían regular los astrocitos son las sinapsis de las fibras musgosas sobre las células de la capa granular, y la sinapsis de las células granulares con sus fibras laterales sobre los neuronas de Purkinje en la capa molecular (Ver esquema, Fig. 18).

En estudios previos se documentó que la PrP<sup>Sc</sup> induce la polimerización y agregación de la tubulina y que la proteína tau es capaz de proteger el desensamble de los microtúbulos inducido por la PrP (Osiecka, Nieznanska, Skowronek, Jozwiak, & Nieznanski, 2011) y que la acumulación y replicación de la PrP<sup>Sc</sup> perturba los procesos biológicos de manera distinta

en diferentes tipos celulares. En el cerebelo las placas de prión tienen un patrón de agregación y localización heterogéneo dependiendo del tipo de EETs (Sikorska et al., 2009), del polimorfismo involucrado y del tiempo de duración de la enfermedad (Gambetti & Notari, 2013), la figura 6 y 9 indican que sin importar la ultraestructura de las placas y su distribución, la fosforilación en la Thr231 en los axones y dendritas de las células de Purkinje y de las fibras paralelas provenientes de las células granulosas es una respuesta a la pérdida neuronal en la capa granular y a la presencia de los agregados de proteína prión, impidiendo la despolimerización de los neurotúbulos y regulando su organización estructural (Fig. 18).



**Figura 18.- Dinámica de la disfunción cerebelar en la ECJ.** Izquierda. Los astrocitos regulan la transmisión glutamatergica de las células granulosas (azul) en cerebelos sanos. Derecha. La PrP<sup>Sc</sup> causa la disfunción de los astrocitos protoplasmáticos (rosa) y su activación en astrocitos reactivos (naranja), provocando un aumento de la concentración de Glu citotóxico provocando la muerte neuronal en la CG (gris) de los glomérulos cerebelosos, activando la fosforilación de tau para impedir la despolimerización de las fibras paralelas que inervan a las células de Purkinje (rojo). CM: Capa molecular. CG: Capa granular. Sb: Sustancia blanca.

Los NFs son el soporte estructural de los axones mielinizados y su interconexión con los microtúbulos son cruciales para la conducción nerviosa efectiva y para el movimiento

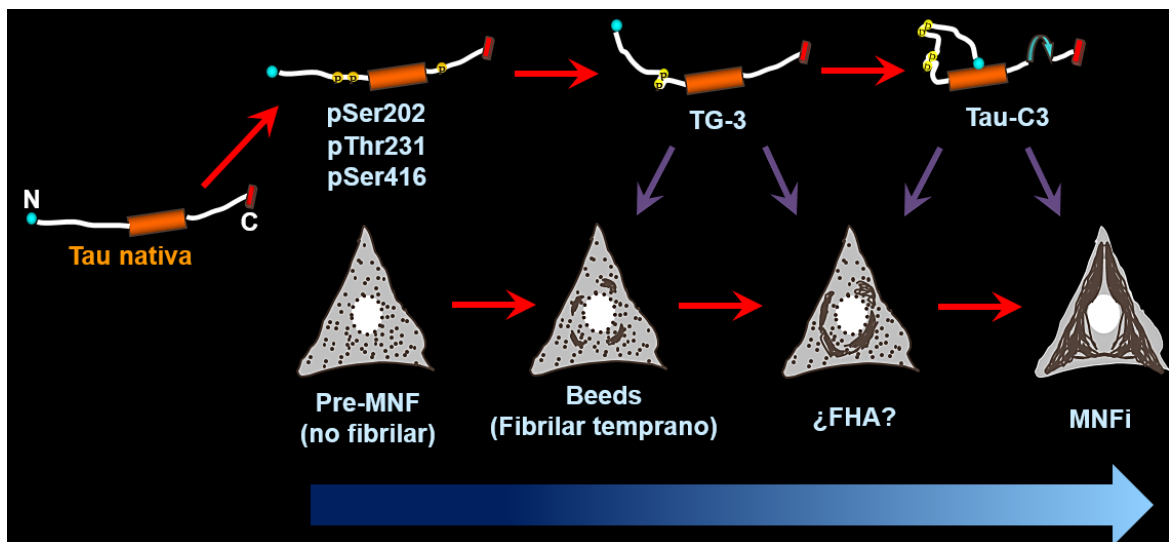
de orgánulos y vesículas sinápticas (Yuan, Rao, Veeranna, & Nixon, 2012), por lo que la figura 10 nos demuestra que su sobreexpresión en el cerebelo está ligada al papel neuroprotector de tau fosforilada en la Thr231 por la presencia de las placas de prión ejemplificado en el esquema de la figura 18.

Por otra parte, en el hipocampo de personas con EA, de acuerdo a los estadios de Brack la formación de MNFs en etapas tempranas inicia en la corteza entorrinal (Estadio I) desde donde se extiende hasta invadir completamente la formación hipocampal (Estadio VI) (Braak & Braak, 1991), sin embargo en nuestro análisis la distribución de premarañas es localizada solo en parte de la capa CA1 próxima al subiculum y en la capa CA2 (Fig. 11). Estructuralmente la organización sináptica del hipocampo recibe aferencias de la capa II/III de la corteza entorrinal de la vía perforante a través del subiculum, donde hacen contacto sináptico excitatorio con las células granulares del giro dentado. Las células granulares proyectan, a través de las fibras musgosas, a las células piramidales de la capa CA3 que a su vez proyectan sus axones a dendritas apicales de las células piramidales en CA2 y CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Las células piramidales de CA1 envían sus axones a la corteza entorrinal a través del subiculum cerrando el circuito (Andersen, Per., Morris, Richard., Amaral, David., Bliss, Tim., and O'keefe, 2007, Cap. 3, pp. 37), por lo que la reacción intracitoplasmática positiva observadas en CA1 y CA2 (Fig. 11) en los casos con EJC, y la presencia de reactividad en las dendritas apicales en el *stratum radiatum* (Fig. 12-c, d) nos sugiere que la fosforilación en la Thr231 puede obedecer al ambiente tóxico producido por las placas de prión, similar a la ocurre con las placas de A $\beta$  en la EA (Reiniger et al., 2011; Šimić et al., 2016), o recibir una señal en respuesta al daño por las vacuolizaciones en el subiculum. En el subiculum se encuentran la mayor cantidad de vacuolizaciones correspondiendo con lo documentado por Arsmtrong (2001) y por Kaneco y colaboradores en el 2008.

El patrón de agregación de tau observado en los casos analizados, demuestran un modelo de agregación distinto al que ocurre en la EA. En primera instancia la ausencia de placas neuríticas denotan la principal diferencia entre los casos de EA y ECJ, sin embargo en la gran cantidad de pre-MNFs se pudieron distinguir los “beeds” (Fig. 13-a) de filamentos densos que dan lugar a las MNFs intraneuronales (Fig.13-c) características de la

EA. De igual manera, nuestros resultados indican que los neurofilamentos son el andamiaje para que la tau sea agregue e invada todo el cuerpo neuronal, iniciando la degeneración de la célula (Fig. 13-e, f). También la aparición de los “*beeds*” en las pre-MNFs indica que las fosforilaciones son eventos de neuroprotección y que los cambios conformacionales demostrados por el TG3 (Cambio conformacional con fosforilación en los aa 231 y 235, Fig. 14-a) y las fosforilaciones evidenciadas por el CP13 (Ser202, Fig. 14-b) y pT416 (Ser416, Fig. 14-e) así como la presencia de la truncación en el Asp421 evidenciada con Tau-C3 (Fig. 14 f-n) son los que dan lugar a los procesos fisiopatológicos en la EA (Giaccone et al., 2008; Martin, Latypova, & Terro, 2011).

La evidencia sugiere que aunque los depósitos de la PrP<sup>Sc</sup> en el cerebro no inducen una taupatía, los cambios neurofibrilares observados en el hipocampo y la integridad de las células de Purkinje proporcionan evidencia directa de que las fosforilaciones en Tau evitan la descomposición de la red de microtúbulos y la muerte neuronal. Nuestra observación de los cambios relacionados con tau en la ECJ tiene un significado diferente desde el punto de vista de la edad de los pacientes, descartando la posibilidad de un hallazgo positivo debido al efecto del envejecimiento (Fig. 19).

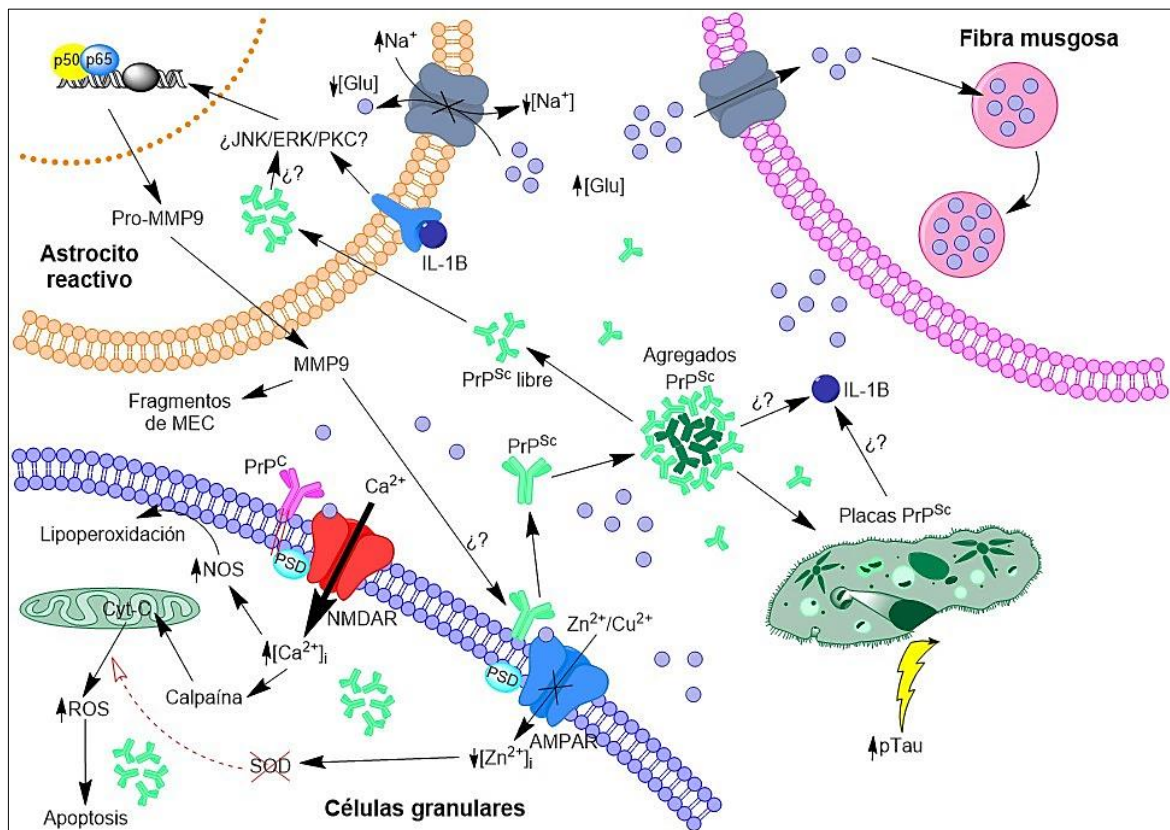


**Figura 19.- Cambios postraduccionales de la proteína tau en los hipocampos de pacientes con Creutzfeldt-Jakob.** Modificaciones postraduccionales encontradas con fosforilaciones y cambios conformacionales tempranos en la proteína tau. La ausencia de reactividad del anticuerpo PHF-1 en los FHA denota un importante diferencia entre la EA y la ECJ, en estos cerebros la agregación de tau en MNFi no aumenta como ocurre en pacientes con EA avanzado, indicando que las fosforilaciones determinan el papel neuroprotector de tau en respuesta a la presencia de las placas de prion y del ambiente tóxico que provocan.

Para confirmar el papel de los astrocitos en la neurodegeneración se realizó un examen más detallado de los cerebelos. La correlación temporal y anatómica entre la acumulación de PrP<sup>Sc</sup>, la astrogliosis reactiva localizada mayormente en la CG (Fig. 15) y la aparición del daño neuropatológico evidenciado por la MMP-9 (Fig. 16) argumentan que la PrP<sup>Sc</sup> tiene una alta tendencia a agregarse desde la sustancia blanca hacia el neuropilo de las capas externas, en diversos estudios se ha demostrado que la astrogliosis es un sello distintivo de las enfermedades por priones y que la PrP<sup>Sc</sup> induce su proliferación (Acevedo-Morantes & Wille, 2014; Hafiz & Brown, 2000; Hetz et al., 2003). La MMP-9 expresada en respuesta a estímulos como péptidos y citosinas pro-inflamatorias liberadas por la neuroinflamación provocada por la partícula priónica (Hsieh & Yang, 2014; Wang, Tan, Yu, & Tan, 2014) y la microglía activada se encuentra presente tanto en pacientes de EETs esporádicas y genéticas, como en modelos animales infectados por el prión (Aguzzi et al., 2013). La microglía libera la interleucina IL1- $\beta$  en respuesta a la neurocitotoxicidad provocada por los agregados de PrP<sup>Sc</sup> similar a lo que ocurre en la EA con las placas de A $\beta$  (Arendt et al., 2016), y a su vez es la que promueve la secreción de la MMP-9 por los astrocitos reactivos (Hsieh & Yang, 2014; Wang et al., 2014). Por otro lado, se sabe que la PrP<sup>C</sup> modula a los receptores de Glu de tipo NMDA mediando la plasticidad y la transmisión sináptica (Biasini, Turnbaugh, Unterberger, & Harris, 2012) y actuando como un sensor de iones divalentes regulando el balance del Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> vía los receptores AMPA (Kovacs & Budka, 2008; Watt, Griffiths, & Hooper, 2013). Podemos hipotetizar que la astrogliosis eleva la concentración del Glu extracelular conduciendo a la hiperexcitabilidad de los receptores NMDA, estos a su vez provocan la elevación del Ca<sup>2+</sup> intracelular elevando la concentración de NOS y la liberación de Cyt-C vía calpaína conduciendo a la apoptosis por estrés oxidativo. El papel de los receptores AMPA puede estar relacionado con la disfunción de la superóxido dismutasa (SOD) por la disminución en la concentración de sus cofactores enzimáticos (Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>) debido a la pérdida de la función de la PrP<sup>C</sup> por su conversión en la PrP<sup>Sc</sup> y su proteólisis por la actividad de la MMP-9 (Ver esquema de la Fig. 20).

La distribución regional de los astrocitos reactivos en el cerebelo fue observada paralela a la topografía de la PrP<sup>Sc</sup>, sin embargo la evidencia del ADN fragmentado exclusivamente en la capa de células granulares (Ver Fig. 17) apunta a que el daño es producido por los radicales libres productos de la actividad astrocíticas elevada y al exceso de Glu extracelular

(Pathmajeyan et al., 2011). Sin embargo, estudios inmunocitoquímicos y de expresión de ARNm de Bax, Bcl-2, Fas y Casp-3 muestran inconsistencias ya que solo observaron sobreexpresión de Bax pero no de Casp-3 (Kovacs & Budka, 2008). Con los resultados anteriores y la evidencia bibliográfica se puede hipotetizar que una forma tóxica de PrP se produce directamente a partir de PrP<sup>C</sup> expresada en las células granulares, descartando el concepto del papel neurotóxico directo de las placas de PrP<sup>Sc</sup>. Nuestro trabajo apoya a la apoptosis como una vía de muerte celular relevante en los cerebelos con ECJ, sin embargo es posible que esta vía no sea la única que se active, o en su caso que esta sea activada por una vía diferente.



**Figura 20.- Esquema hipotético del ambiente neurotóxico producido por la proliferación de astrocitos reactivos y su relación con la pérdida de función de la PrP<sup>C</sup> en el cerebelo.** Los astrocitos pueden ser estimulados por cascadas de señalización que resultan en efectos perjudiciales para el entorno neuronal. La hiperexcitabilidad de los receptores NMDA y la pérdida de la función de los receptores AMPA para mantener el balance de los iones Zn<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> pueden conducir al aumento del estrés oxidativo conduciendo a la muerte celular. El cambio conformacional de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> inicia la agregación de las placas insolubles produciendo una respuesta neuroinflamatoria de la microglía liberando citoquinas pro-inflamatorias que activan la astrogliosis. Tanto la muerte de las células granulares como el ambiente tóxico producido por las placas de príon podrían iniciar la señal de fosforilación en tau para mantener la inervación sobre las células de Purkinje.

## 9. CONCLUSIONES

La neuropatogénesis de las enfermedades de priones evoluciona de manera compleja aunque tiene ciertas características clínicas similares con otras taupatías, específicamente con el Alzheimer, varios eventos moleculares patogénicos pueden distinguir a la ECJ de otras enfermedades neurodegenerativas. El daño del tejido en las prionopatías puede ser el resultado de varias vías, (1) mientras que la acumulación intracelular de las formas de PrP podría afectar la función celular y conducir a la muerte neuronal, la deposición extracelular de las placas de PrP<sup>Sc</sup> puede que no sea el factor citotóxico directo, y que sea la PrP<sup>Sc</sup> libre observada alrededor de las placas densas. (2) Similar a lo que ocurre en la EA, la proteína tau parece responder a la presencia de las placas de prión, iniciando eventos de fosforilaciones de neuroprotección y (3) las características histopatológicas detectables, astrogliosis y elevada expresión de MMP-9, que parecen conducir a la muerte neuronal. Dado que los mecanismos de la degeneración parecen ser múltiples en las enfermedades de priones, nuestros estudios futuros se enfocaran en revelar la secuencia específica de estos procesos y establecer cual vía es la decisiva en la infección empleando modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.



## 10. PERSPECTIVAS

Los trabajos a futuro relacionados a los resultados obtenidos en este trabajo estarán enfocados en determinar el papel fundamental de la proteína tau en respuesta a la infección por la proteína prión en el hipocampo, y establecer los cambios postraduccionales que estén involucrados en esa respuesta durante las etapas iniciales de la infección, empleando para ello cultivos celulares y ratones transgénicos infectados con la partícula priónica.

Otro aspecto a tratar en posteriores experimentos será, analizar las vías de señalización que se encuentren involucradas directamente en la respuesta astrocítica elevada, así como el mecanismo que lleva a la muerte neuronal de las células granulares del cerebelo. De la misma forma que en el cerebelo, se realizara un análisis exhaustivo del posible papel del ambiente tóxico generado por las placas de prión en el hipocampo y la distribución de los astrocitos reactivos y de las células en apoptosis empleando el tejido fijado en PFA.

Los resultados obtenidos serán relacionados con las bases de datos de interacción proteína-proteína de la PrP para intentar establecer y esclarecer cómo se lleva a cabo la disfunción neuronal en las enfermedades priónicas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Morantes, C., & Wille, H. (2014). The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models — Considerations and Pitfalls. *Viruses*, 6(10), 3875–3892. <http://doi.org/10.3390/v6103875>
- Aguzzi, A., Nuvolone, M., & Zhu, C. (2013). The immunobiology of prion diseases. *Nature Reviews Immunology*, 13(12), 888–902. <http://doi.org/10.1038/nri3553>
- Aguzzi, A., Sigurdson, C., & Heikenwaelder, M. (2008). Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annual Review of Pathology*, 3, 11–40. <http://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154326>
- Alpers, M. P. (2008). Review. The epidemiology of kuru: monitoring the epidemic from its peak to its end. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1510), 3707–13. <http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0071>
- Alzheimer's Association. (2015). 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 11(3), 332–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25984581>
- Andersen, Per., Morris, Richard., Amaral, David., Bliss, Tim., and O'keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book - Google Libros*. New York: Oxford University Press, Inc. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=zg6oyF1DziQC&pg=PA37&lpg=PA37&dq=the+hippocampal+book&source=bl&ots=iE7k4QLPsC&sig=KHhomwvAegvxUuN6i7Tmd\\_BinSE&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjH2-qe3-DRAhVI6mMKHV0NC0UQ6AEITDAG#v=onepage&q=the hippocampal book&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=zg6oyF1DziQC&pg=PA37&lpg=PA37&dq=the+hippocampal+book&source=bl&ots=iE7k4QLPsC&sig=KHhomwvAegvxUuN6i7Tmd_BinSE&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjH2-qe3-DRAhVI6mMKHV0NC0UQ6AEITDAG#v=onepage&q=the%20hippocampal%20book&f=false)
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, 126, 238–292. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Asante, E. A., Smidak, M., Grimshaw, A., Houghton, R., Tomlinson, A., Jeelani, A., ... Collinge, J. (2015). A naturally occurring variant of the human prion protein

- completely prevents prion disease. *Nature*, 522(7557).  
<http://doi.org/10.1038/nature14510>
- Béranger, F., Mangé, A., Goud, B., & Lehmann, S. (2002). Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38972–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M205110200>
- Biasini, E., Turnbaugh, J. A., Unterberger, U., & Harris, D. A. (2012). Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends in Neurosciences*, 35(2), 92–103.  
<http://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.002>
- Blase, J. L., Cracco, L., Schonberger, L. B., Maddox, R. A., Cohen, Y., Cali, I., & Belay, E. D. (2014). Sporadic fatal insomnia in an adolescent. *Pediatrics*, 133(3), e766-70.  
<http://doi.org/10.1542/peds.2013-1396>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239–259. <http://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Brown, P., & Farrell, M. (2015). A Practical Approach to Avoiding Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) from Invasive Instruments. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 36(7), 1–5. <http://doi.org/10.1017/ice.2015.53>
- Center for Disease Control and Prevention. (n.d.). Prion Diseases. Retrieved May 2, 2016, from <http://www.cdc.gov/prions/>
- Chi, N.-F., Lee, Y.-C., Lu, Y.-C., Wu, H.-M., & Soong, B.-W. (2010). Transmissible spongiform encephalopathies with P102L mutation of PRNP manifesting different phenotypes: clinical, neuroimaging, and electrophysiological studies in Chinese kindred in Taiwan. *Journal of Neurology*, 257(2), 191–7.  
<http://doi.org/10.1007/s00415-009-5290-4>
- Creutzfeldt-Jakob Disease Foundation. (n.d.). Retrieved May 2, 2016, from <http://www.cjdfoundation.org/>
- du Plessis, D. G. (2008). Prion protein disease and neuropathology of prion disease.

- Neuroimaging Clinics of North America*, 18(1), 163–82; ix.  
<http://doi.org/10.1016/j.nic.2007.12.003>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2007). *Capacity Building for Surveillance and Prevention of BSE and Other Zoonotic Diseases*. Rome. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-a1000e.pdf>
- GAJDUSEK, D. C., GIBBS, C. J., & ALPERS, M. (1966). Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature*, 209(5025), 794–796.  
<http://doi.org/10.1038/209794a0>
- Gajdusek, D. C., & Zigas, V. (1959). Kuru. *The American Journal of Medicine*, 26(3), 442–469. [http://doi.org/10.1016/0002-9343\(59\)90251-7](http://doi.org/10.1016/0002-9343(59)90251-7)
- Gambetti, P., Cali, I., Notari, S., Kong, Q., Zou, W.-Q., & Surewicz, W. K. (2011). Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases. *Acta Neuropathologica*, 121(1), 79–90. <http://doi.org/10.1007/s00401-010-0761-3>
- Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., & Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *British Medical Bulletin*, 66(1), 213–39.  
<http://doi.org/10.1093/BMB/66.1.213>
- Gambetti, P., & Notari, S. (2013). Human Sporadic Prion Diseases. In *Prions and Diseases* (pp. 59–72). New York, NY: Springer New York.  
[http://doi.org/10.1007/978-1-4614-5338-3\\_4](http://doi.org/10.1007/978-1-4614-5338-3_4)
- Giaccone, G., Mangieri, M., Capobianco, R., Limido, L., Hauw, J. J., Haïk, S., ... Tagliavini, F. (2008). Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiology of Aging*, 29(12), 1864–1873.  
<http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.026>
- Gibbs, C. J., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M., & Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob Disease (Spongiform Encephalopathy): Transmission to the Chimpanzee. *Science*, 161(3839).
- Gozes, I. (2010). Tau pathology: predictive diagnostics, targeted preventive and

- personalized medicine and application of advanced research in medical practice. *The EPMA Journal*, 1(2), 305–16. <http://doi.org/10.1007/s13167-010-0029-y>
- Hafiz, F. B., & Brown, D. R. (2000). A Model for the Mechanism of Astrogliosis in Prion Disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16(3), 221–232. <http://doi.org/10.1006/mcne.2000.0868>
- Hetz, C., Maundrell, K., & Soto, C. (2003). Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends in Molecular Medicine*, 9(6), 237–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829011>
- Hsiao, K., Dlouhy, S. R., Farlow, M. R., Cass, C., Da Costa, M., Michael Conneally, P., ... Prusiner, S. B. (1992). Mutant prion proteins in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genetics*, 1(1), 68–71. <http://doi.org/10.1038/ng0492-68>
- Hsieh, H.-L., & Yang, C.-M. (2014). The role of matrix metalloproteinase-9 in pro-inflammatory factors-induced brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Inflammation and Cell Signaling*, 1(1).
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virology Journal*, 8(1), 559. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-559>
- Institute of Pathology Case Western Reserve University. (n.d.). National Prion Disease Pathology Surveillance Center. Retrieved from <http://case.edu/med/pathology/centers/npdpssc/>
- Jansen, C., Parchi, P., Jelles, B., Gouw, A. A., Beunders, G., van Spaendonk, R. M. L., ... Rozemuller, A. J. M. (2011). The first case of fatal familial insomnia (FFI) in the Netherlands: a patient from Egyptian descent with concurrent four repeat tau deposits. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(5), 549–553. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01126.x>
- Jayadev, S., Nochlin, D., Poorkaj, P., Steinbart, E. J., Mastrianni, J. A., Montine, T. J., ... Leverenz, J. B. (2011). Familial prion disease with Alzheimer disease-like tau

- pathology and clinical phenotype. *Annals of Neurology*, 69(4), 712–20.  
<http://doi.org/10.1002/ana.22264>
- Jeffrey, M., & González, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33(4), 373–94.  
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00868.x>
- Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (2015). Clinical update of Jakob-Creutzfeldt disease. *Current Opinion in Neurology*, 28(3), 302–10.  
<http://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000197>
- Kovacs, G. G., & Budka, H. (2008). Prion diseases: from protein to cell pathology. *The American Journal of Pathology*, 172(3), 555–65.  
<http://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070442>
- Liberski, P. P., Sikorska, B., & Brown, P. (2012). Kuru: the first prion disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 724, 143–53. [http://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2\\_12](http://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_12)
- Lindenbaum, S. (2008). Review. Understanding kuru: the contribution of anthropology and medicine. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1510), 3715–20. <http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0072>
- Luna-Muñoz, J., Zamudio, S., De la Cruz, F., Minjarez-Vega, B., & Mena, R. (2012). Acción protectora de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 13(3), 160–167.
- Ma, J., Wollmann, R., & Lindquist, S. (2002). Neurotoxicity and Neurodegeneration When PrP Accumulates in the Cytosol. *Science*, 298(5599).
- Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 58(4), 458–471. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.023>
- Mastrianni, J. A. (2010). The genetics of prion diseases. *Genetics in Medicine*, 12(4), 187–

195. <http://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd7374>
- Mastrianni, J. A. (2014, January 2). Genetic Prion Diseases. University of Washington, Seattle. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1229/>
- Montagna, P. (2005). Fatal familial insomnia: a model disease in sleep physiopathology. *Sleep Medicine Reviews*, 9(5), 339–353. <http://doi.org/10.1016/j.smr.2005.02.001>
- Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P., & Lugaresi, E. (2003). Familial and sporadic fatal insomnia. *The Lancet Neurology*, 2(3), 167–176. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00323-5](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00323-5)
- Moody, K. M., Schonberger, L. B., Maddox, R. A., Zou, W.-Q., Cracco, L., Cali, I., ... Collinge, J. (2011). Sporadic fatal insomnia in a young woman: A diagnostic challenge: Case Report. *BMC Neurology*, 11(1), 136. <http://doi.org/10.1186/1471-2377-11-136>
- Neurodegeneration and Prion Disease*. (2005). Springer Science & Business Media. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=GvAJVTHARq4C&pgis=1>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Evaluación y reforzamiento del sistema de prevención de la EEB y el Sistema de Control de Calidad de Piensos, Marzo 22 (2003).
- Osiecka, K. M., Nieznanska, H., Skowronek, K. J., Jozwiak, J., & Nieznanski, K. (2011). Tau inhibits tubulin oligomerization induced by prion protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(10), 1845–1853. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.016>
- Parchi, P., Capellari, S., Chin, S., Schwarz, H. B., Schechter, N. P., Butts, J. D., ... Gambetti, P. (1999). A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology*, 52(9), 1757–63. <http://doi.org/10.1212/WNL.52.9.1757>
- Pathmajeyan, M. S., Patel, S. A., Carroll, J. A., Seib, T., Striebel, J. F., Bridges, R. J., & Chesebro, B. (2011). Increased excitatory amino acid transport into murine prion protein knockout astrocytes cultured in vitro. *Glia*, 59(11), 1684–1694.

<http://doi.org/10.1002/glia.21215>

- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, *216*(4542), 136–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801762>
- Reiniger, L., Lukic, A., Linehan, J., Rudge, P., Collinge, J., Mead, S., & Brandner, S. (2011). Tau, prions and A $\beta$ : the triad of neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, *121*(1), 5–20. <http://doi.org/10.1007/s00401-010-0691-0>
- Sato, T. (2003). [Infectious prion disease: CJD with dura mater transplantation]. *Rinshō Shinkeigaku = Clinical Neurology*, *43*(11), 870–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15152489>
- Schmitz, M., Dittmar, K., Llorens, F., Gelpi, E., Ferrer, I., Schulz-Schaeffer, W. J., & Zerr, I. (2016). Hereditary Human Prion Diseases: an Update. *Molecular Neurobiology*, 1–12. <http://doi.org/10.1007/s12035-016-9918-y>
- Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B., & Raab, W. H.-M. (2008). The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Research Bulletin*, *77*(6), 343–55. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.09.012>
- Shi, X.-H., Han, J., Zhang, J., Shi, Q., Chen, J.-M., Xia, S.-L., ... Dong, X.-P. (2010). Clinical, histopathological and genetic studies in a family with fatal familial insomnia. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(2), 292–297. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.01.007>
- Shibuya, S., Higuchi, J., Shin, R.-W., Tateishi, J., & Kitamoto, T. (1998). Codon 219 lys allele of PRNP is not found in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of Neurology*, *43*(6), 826–828. <http://doi.org/10.1002/ana.410430618>
- Sikorska, B., Liberski, P. P., Sobów, T., Budka, H., & Ironside, J. W. (2009). Ultrastructural study of florid plaques in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a comparison with amyloid plaques in kuru, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*,



35(1), 46–59. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00959.x>

Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., ... Hof, P. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*, 6(1), 6. <http://doi.org/10.3390/biom6010006>

Smith, C. B., Booth, C. J., & Pedersen, J. A. Fate of prions in soil: a review. *Journal of Environmental Quality*, 40(2), 449–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tranchant, C., Sergeant, N., Wattez, A., Mohr, M., Warter, J. M., & Delacourte, A. (1997). Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63, 240–246.

Wang, X.-X., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2014). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2014, 908636. <http://doi.org/10.1155/2014/908636>

Watt, N. T., Griffiths, H. H., & Hooper, N. M. (2013). Neuronal zinc regulation and the prion protein. *Prion*, 7(3), 203–8. <http://doi.org/10.4161/pri.24503>

Wells, G. A. H., & Wilesmith, J. W. (1995). The Neuropathology and Epidemiology of Bovine Spongiform Encephalopathy. *Brain Pathology*, 5(1), 91–103. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00580.x>

Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., ... Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *The Veterinary Record*, 121(18), 419–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3424605>

Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., & Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *The Veterinary Record*, 128(9), 199–203. <http://doi.org/10.1136/VR.128.9.199>

- Will, R. G. (2003). Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *British Medical Bulletin*, 66(1), 255–65. <http://doi.org/10.1093/BMB/66.1.255>
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., ... Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet (London, England)*, 347(9006), 921–5. <http://doi.org/10.5555/URI:PII:S0140673696914129>
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2012). Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(14).
- Zabel, M. D., Reid, C., Aguzzi, A., Weissmann, C., Alper, T., Cramp, W., ... Wang, F. (2015). A brief history of prions. *Pathogens and Disease*, 73(9), ftv087. <http://doi.org/10.1093/femspd/ftv087>

## 12. ANEXOS

### 10.1 Casos examinados<sup>1</sup> hasta febrero de 2017 en EU por el *National Prion Disease Pathology Surveillance Center*.

Año	Referencias <sup>2</sup> Totales	Enfermedad por priónes	Esporádica	Familiar	Iatrogénica	nvECJ
1996	57	36	31	4	1	0
1997	113	68	59	9	0	0
1998	89	53	44	7	1	0
1999	121	73	65	7	1	0
2000	144	101	89	12	0	0
2001	209	118	110	8	0	0
2002	242	144	124	18	2	0
2003	259	161	138	21	2	0
2004	314	179	161	17	0	1 <sup>3</sup>
2005	327	179	157	21	1	0
2006	367	181	161	17	1	2 <sup>4</sup>
2007	372	208	189	19	0	0
2008	386	222	206	16	0	0
2009	399	233	212	20	1	0
2010	402	246	218	28	0	0
2011	394	240	216	24	0	0
2012	409	241	218	23	0	0
2013	415	257	222	34	1	0
2014	355	209	186	21	1	1 <sup>5</sup>
2015	396	260	239	20	0	0
2016	393	275	231	29	0	0
2017	35	20	0	0	0	0
<b>Total</b>	6202 <sup>6</sup>	3706 <sup>7</sup>	3279 <sup>8</sup>	375 <sup>9</sup>	12	4

<sup>1</sup> Listado basado en el año de la muerte o, si no está disponible, en el año de referencia; <sup>2</sup> Casos con sospecha de enfermedad de priónes para la cual se presentó tejido cerebral; <sup>3</sup> Enfermedad adquirida en el Reino Unido; <sup>4</sup> Enfermedades adquiridas en el Reino Unido en un caso y en Arabia Saudita en el otro; <sup>5</sup> Enfermedad posiblemente adquirida en un país de Oriente Medio o Europa Oriental; <sup>6</sup> Incluye 14 casos en los que el diagnóstico está pendiente y 20 casos no concluyentes; <sup>7</sup> Incluye 36 casos (20 de 2017) con la determinación de tipo pendiente en la que se ha excluido el diagnóstico de la nvECJ. <sup>8</sup> Los casos esporádicos incluyen 3621 casos de ECJe, 57 casos de Prionopatía Proteasa-sensible variable (VPSPr en inglés) y 28 casos de Insomnio Fatal Esporádico (IFe). <sup>9</sup> El total no incluye 221 casos familiares diagnosticados sólo con análisis de sangre.