

DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES HUMANAS

Lic. *Christián Begué*

DEPARTAMENTO DE NEUROLOGÍA
FLENI

DIRECCIÓN DE CONTACTO: FLENI. MONTAÑESES 2325. C1428AQK. BUENOS AIRES // cbegue@fleni.org.ar

INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) también llamadas enfermedades por *priones* (o *priónicas*), son patologías neurodegenerativas, raras e incurables que afectan un amplio rango de especies huésped mamíferas. La Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (CJe) es la más común de las EETs humanas (85%).

La singularidad más llamativa de estas patologías, que conforman un nuevo paradigma, es que a diferencia del resto de las enfermedades que o bien son causadas por una infección o tienen origen genético como condición excluyente, las EETs pueden tener ambas causas. Esto se puede explicar, según la hipótesis más consensuada, si el agente etiológico es una proteína anómala del huésped y sin mediación de ácidos nucleicos.

EL AGENTE ETIOLÓGICO

El agente causante de estas patologías, según la hipótesis de *solo-proteína* o del *prion*^{1,2}, es una proteína del huésped con su plegamiento normal alterado, capaz de transmitir y propagar variabilidad conformacional³. Esta afirmación se apoya en que el componente más importante, aislado en las fracciones infectivas purificadas de homogenatos de SNC afectados por una EET, resultó ser una proteína codificada por el genoma del huésped. A su vez, a partir de estas mismas fracciones no fue

posible aislar ácidos nucleicos específicos (ADN o ARN)^{3,4}.

S. Prusiner, en 1982, publicó un artículo en *Science*, donde alegó haber identificado el agente causante del *scrapie*, el arquetipo de las EETs que afecta a ovejas y cabras, y que éste era una "partícula infecciosa de carácter proteico" que denominó *prion*². Las propiedades inusuales del agente del *scrapie*, en particular, la resistencia a formol, alcohol, calor, pHs bajos, ribonucleasas, deoxirribonucleasas, y radiaciones ionizantes -como luz UV a 254nm- (tratamientos que inactivan a los ácidos nucleicos), ponían en duda la idea de que se tratase de un virus, al menos un virus convencional. La infectividad sólo decrecía al tratar las fracciones con proteasas u otro tratamiento que afecte la estabilidad de las proteínas como la desnaturación con urea, dodecil sulfato de sodio, sales caotrópicas (tiocianato de guanidina⁵) o fenol; no así con nucleasas, lipasas, ni glicosidasas⁶.

Todos los humanos poseen la proteína *prion* normal llamada PrPc (-c- de celular). El gen *Prnp*, que codifica la síntesis de PrP humana, fue clonado en 1985 por Hsiao y colaboradores, quienes comprobaron el vínculo entre algunas mutaciones y el desarrollo de una EET en un individuo⁷.

El término *prion* se encuentra en la literatura generalmente referido a las isoformas patogénicas de PrP, consideradas el principio activo infeccioso de las EETs. Estas isoformas también son llamadas

PrPsc (por *scrapie*) o PrPjc (por Jakob-Creutzfeldt) o PrPres (por resistencia a proteasa K) o PrP27-30 (por ser 27-30 kDa el peso molecular relativo de la isoforma biglicosilada luego de la hidrólisis del dominio amino-terminal de PrP sensible a PK.

Dos trabajos marcaron el antes y después en la investigación sobre *priones*. El primero describe el descubrimiento por S. Prusiner y cols. de la resistencia del *prion* a la degradación proteolítica total [h]. La digestión con 50 ug/ml de proteasa K (PK) a 37° C durante dos horas no degrada el dominio carboxi-terminal de PrPsc ni disminuye el título de infectividad de la preparación. Con concentraciones mayores de proteasa finalmente el título disminuye pero la infectividad no es eliminada totalmente. Esto determinó que la detección de PrPsc fuera considerada el primer marcador confiable y seguro de infección por el agente de las EETs. Esta tecnología hoy, más de 25 años después, continúa siendo el *gold standard* de todos los diagnósticos bioquímicos disponibles para las EETs. El segundo gran experimento verificó una crucial predicción de la hipótesis de *solo-proteína*. Si PrPsc se propaga modificando la conformación tridimensional de PrPc del huésped, entonces organismos que no posean el gen para PrPc deberían ser resistentes a la infección por *priones*⁹. En 1990 la tecnología para remover un gen específico del genoma de un mamífero era muy reciente¹⁰, pero C. Weissman y H. Büeller consiguieron generar ratones sin el gen *Prnp*¹¹ (llamados *Knock Out* o PrP-/-). Los ratones PrP-/- sobreviven bien, con algunas anormalidades menores^{12,13,14,15}, algunas ni siquiera relacionadas con el gen *Prnp*¹⁶. Estos ratones fueron inoculados intracerebralmente con homogenatos de cerebro de ratones enfermos de *scrapie* y durante el curso de su vida no se enfermaban ni producían replicación subclínica del agente infeccioso^{17,18}. Este trabajo ha sido invocado como la "prueba final" a favor de la hipótesis de *solo-proteína*, pero el experimento del ratón *Knock Out* de *Prnp* se diseñó para refutar la hipótesis del *prion*. Como ocurre con los resultados negativos, otras interpretaciones son posibles¹⁹. Los escépticos a la hipótesis del *prion* señalaron que PrPc podría ser el receptor del todavía no identificado virus y cuya remoción confería resistencia a los ratones PrP-/. Aún así este intento de falsación de la hipótesis del *prion* corroborado por la resistencia al *scrapie* por parte de estos ratones es muy significativo.

PrPc, además de ser crucial para la replicación de PrPsc, es necesaria para que exista daño neu-

ronal²⁰. En 1996 Isenman y colaboradores usaron ratones PrP-/- a los que les injertaron tejido neuronal de otros ratones que sobre-expresaban PrPc (poseían más copias funcionales del gen *Prnp* que los ratones normales -o *wild type*-), luego los inocularon intracerebralmente con PrPsc de *scrapie*. Como resultado, los injertos (*graphs*) neuroectodérmicos acumularon altos niveles de PrPsc e infectividad y desarrollaron severos cambios histopatológicos característicos de *scrapie*. La PrPsc producida en los tejidos afectados migró inclusive hasta áreas distantes de los injertos que también contenían infectividad, sin embargo, luego de 16 meses desde los trasplantes e infección con *priones* no se detectaron cambios patológicos en los tejidos PrP-/-, ni siquiera en las inmediaciones del injerto o de los depósitos de PrPsc. Estos resultados demostraron que PrPsc no es inherentemente tóxica y abrían la posibilidad de que las placas de PrPsc encontradas en las EETs sean un epifenómeno más que la causa del daño neuronal²¹.

Otros experimentos importantes en la búsqueda de prueba definitiva que corrobore o descarte la teoría del *prion* fueron realizados por Saborio, Soto y cols en 2001²², quienes crearon un sistema *in vitro* para amplificar PrPsc con ciclos de sonicación seguidos de incubaciones, colocando en tubos pequeñas cantidades PrPsc de homogenatos de cerebro de hamsters infectados junto con homogenatos de cerebro sanos. La idea detrás de este experimento fue que la sonicación puede fracturar los agregados de PrPsc en unidades más pequeñas y que cada una pueda actuar como una "unidad infecciosa" independiente sobre PrPc. Este método es llamado "*protein misfolding cyclic amplification*" (PMCA). Cuando las moléculas PrPc -sanas- se transformaron en PrPsc -anómalas-, se realizaron diluciones y repeticiones una y otra vez hasta que las únicas proteínas PrPsc presentes fueran las generadas *de novo* en los tubos de ensayo²³. Esta PrPsc nueva luego fue inyectada en cerebros de hamsters sanos que comenzaron a tener síntomas de EETs dentro de los cuatro meses y en promedio murieron en menos de seis meses luego de la inoculación²⁴. Durante el año 2005, Soto y colaboradores usando la tecnología ya descrita, presentaron evidencia de que las esquivas proteínas infecciosas pueden ser reproducidas en sistemas completamente libres de material celular adquiriendo características estructurales similares a las de los *priones* naturales. Sin embargo, estos *priones* artificiales no son capaces de reproducir la infección y sólo cuando se

preparan a partir de homogenatos de cerebro sano e inóculos infectivos *infinitesimales* se puede reproducir la condición de infectividad. Si bien estos experimentos al utilizar homogenatos de cerebro sano como sustrato no pudieron ser tomados como una demostración formal de la hipótesis de *solo-proteína*, son una evidencia fuerte²⁵.

CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LAS EETS HUMANAS

Las EETS humanas comprenden al kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en sus formas esporádica (CJe), genética (CJf) e iatrogénica (CJi), al síndrome de Gerstmann-Sträussler -también llamado enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Sheinker (GSS) genética-, al insomnio familiar fatal (IFF) o su forma esporádica (IFe), y a la ECJ variante (CJv) -que está asociada a la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB)-. Estos síndromes han sido comentados en detalle en el artículo "Encefalopatías Espongiiformes Transmisibles" por la Dra Ana Lia Taratuto, en esta misma revista en septiembre de 1997, páginas 42 a 54.

Las categorías principales de ECJ son: a) El CJ esporádico, la enfermedad aparece aun cuando la persona no tiene factores conocidos de riesgo para la enfermedad, manifestándose en aproximadamente el 85 % de los casos. b) El CJ genético, el paciente tiene historial familiar de la enfermedad o pruebas positivas de mutación genética asociada con el gen *Prnp*. El 5 a 10 % de los casos son CJ genéticos. c) El CJ adquirido, la enfermedad es transmitida por exposición del agente al tejido cerebral o sistema nervioso del paciente, comúnmente mediante ciertos procedimientos médicos que involucran instrumental mal esterilizado o trasplantes de un dador afectado. Desde que el CJ se describiera por primera vez en el año 1920, menos del 1% de los casos han sido de CJ adquirido. El CJ clásico -ie. el esporádico- se caracteriza por una demencia rápidamente progresiva, mioclonías, disturbios visuales y/o cerebelosos, signos de disfunción piramidal y/o extrapiramidal y mutismo akinético; un electroencefalograma típico con actividad pseudo periódica²⁶, y/o 14-3-3 positivo en LCR. El CJe tiene una incidencia de un caso por millón de población por año^{27,28}. La duración mediana y media una vez establecida la enfermedad es de 4,5 y 8 meses respectivamente, el 90% de los casos muere dentro del año desde el comienzo

de síntomas y sólo el 4% de los casos sobrevive más allá de los 2 años²⁹; el rango de edad de los afectados es de 45-75 años con ligeras variaciones. Pueden existir además otras características clínicas menos frecuentes y específicas: alucinaciones, disturbios del sueño, pérdida de peso, ansiedad, fatiga y trastornos de la conducta.

DIAGNÓSTICO EN LAS EETS

Diagnóstico clínico

En las EETS, si bien existen una serie de técnicas diagnósticas de certeza y pruebas auxiliares no se puede efectuar un diagnóstico definitivo en la etapa preclínica, dado que no se han validado métodos de detección de PrPsc en sangre o LCR. La detección temprana de casos sospechosos de CJ se basa en signos y síntomas clínicos.

Diagnóstico neuropatológico y molecular

El estudio neuropatológico constituye el diagnóstico de certeza requerido para caso CJ *definido*. Se puede basar en autopsia o biopsia del SNC. El compromiso de la sustancia gris (corteza, ganglios de la base/cerebelo) consiste en cambios espongiiformes característicos, hiperplasia astrogliar e inmuno-marcación positiva para PrPres, tipo sináptica, neuronal, perivacuolar y/o en placa.

La biopsia cerebral para el diagnóstico de certeza *antemortem*, se basa en la neuropatología y/o *Western Blot* de PrPsc. Dada la posibilidad de transmisión horizontal por instrumental quirúrgico e invasividad, la OMS sugiere realizar biopsia sólo en los casos en que se plantee diagnóstico diferencial con otras patologías tratables, bajo medidas de bioseguridad adecuadas de acuerdo a consensos internacionales.

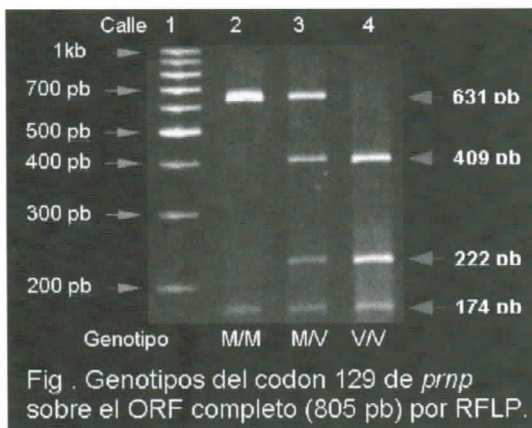
Los diagnósticos moleculares se apoyan en una combinación de técnicas genéticas y bioquímicas, siempre sobre casos con una clínica y neuropatología compatibles con CJ.

Técnicas genéticas y el codón 129

La secuenciación completa del gen *Prnp*, que codifica para PrPc humana, permite la detección de las formas genéticas de CJ y la caracterización

del codón polimórfico 129. Está demostrado por estudios con animales de laboratorio y pacientes que la homocigocidad para metionina en el codón 129 de esta proteína es un factor de susceptibilidad para desarrollar estas patologías. El genotipo metionina/metionina en el codón 129 está claramente sobrerrepresentado en los pacientes con CJe; además, el 100% de los casos de CJv establecidos (*) son metionina/metionina en el codón 129. Este polimorfismo tiene un efecto considerable sobre la presentación clínica, bioquímica y neuropatológica de la enfermedad³⁰. La hipótesis detrás de este aumento de la susceptibilidad en los individuos homocigotos para este codón, supone que si la propagación se produce por un mecanismo catalítico entre *priones* normales y anómalos, al haber un único *pool* de proteínas portadoras de metionina en este sitio polimórfico de PrP, (en lugar de dos *pools* compitiendo, como sería el caso de los individuos heterocigotos metionina / valina), la interacción se producirá de modo más rápido y eficiente, acelerando la aparición de los síntomas. Se ha descrito un único caso CJv, detectado preclínicamente, con autopsia, (en un ganglio cervical y en bazo, no en cerebro) con genotipo heterocigota *-ie. metionina/valina-*, que recibió transfusión de sangre de un paciente que subsecuentemente desarrolló CJv [ae], esta única excepción muestra que individuos heterocigotos son susceptibles al CJv pero el período de incubación se alarga por encima del tiempo de vida de los portadores.

El codón 129 es caracterizable alternativamente, en los pacientes CJ *definido, probable o posible*, mediante la técnica de *RFLP*, utilizando enzimas de restricción, como ilustra la siguiente figura.



* Se ha descrito un único caso MV129 en fase asintomática preclínica. Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. Lancet. 2004. 364:527-9.

Esta misma técnica molecular permite caracterizar mutaciones puntuales. Entre ellas, la más frecuente en el CJf, es la mutación que introduce lisina (K) en lugar de glutamato (E) en el codón 200 de *Prnp* (E200K). Existen varios *clusters* portadores de esta mutación, uno de ellos de origen chileno que abarca los casos detectados en la región patagónica argentina y constituyen aproximadamente el 12% de la serie de CJ *definido*, otro grupo similar esta descrito en judíos libios³².



Técnicas bioquímicas y PrPsc

La base de la caracterización de PrPsc, las isoformas anormales de la proteína PrPc, se basa en su resistencia parcial a la degradación proteolítica. PrPc es totalmente degradable por proteasa K (PK), en cambio este tratamiento sobre PrPsc sólo remueve un número variable de aminoácidos en el extremo amino-terminal de la proteína. La proteína normal (PrPc) se expresa en las células como tres isoformas de peso molecular variable, *ie. di-, mono- o no glicosilada*. Cuando estas tres isoformas de PrPsc, son digeridas por PK, previo a la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, la degradación parcial resulta en tres bandas que corresponden a las tres isoformas descritas pero de menor peso molecular. Tomando como ejemplo la isoforma diglicosilada, ésta tiene un peso molecular relativo de 33-35 kDa que luego de la digestión con PK se reduce a 27-30 kDa.

La autoradiografía siguiente ilustra el protocolo estandarizado de un *Western Blot* de PrP (sustancia gris cerebral) donde se observan las tres isoformas de PrP. Calles 1 y 2: control de proteólisis sobre un caso normal (PrP sen = sensible a PK), calles 3 y 4: control CJe positivo (tipo 1 [30]) y calles 5,6 y 7: caso incógnita que resultó positivo para las isoformas de PrPsc. El caso resultó PrPsc positivo tipo 1. PK = tratamiento con Proteasa K.



PrPsc es la única macromolécula específica identificada, hasta ahora, asociada con una EET. Es un marcador fidedigno de infección, estandarizado y validado. Sin embargo, PrPsc no siempre es fácilmente detectable en diversas formas de este grupo de patologías^{33,34,35}.

Actualmente, además de detectar PrPsc en el SNC, es posible detectar PrPsc en bazo, músculo, mucosa olfatoria, nervio raquídeo y las terminales nerviosas de pacientes con CJ esporádico^{36,37,38,39,40}, mientras que en enfermos de CJ variante se observa además en amígdala faríngea y apéndice cecal.

Ha sido muy difícil discriminar PrPc de PrPsc directamente con anticuerpos específicos⁴¹, (ie. suprimiendo la digestión proteolítica previa). Si fuera posible, esto permitiría un aumento de la sensibilidad al quitar el paso de proteólisis del protocolo estándar, ya que en la práctica, cada paso suele ir acompañado de pérdida de masa de las moléculas de interés.

La detección de PrPsc en tejidos linfoides se creía exclusiva de pacientes afectados de CJv, sin embargo, resultados del análisis de músculo y bazo de pacientes con CJe dieron positivos en al menos un tercio de los casos al estudiarlos con técnicas más sensibles que incorporan un paso de precipitación con ácido fosfotúngstico³⁶. No es posible discriminar aún si los casos CJe con PrPsc extraneural representan un subgrupo de los pacientes con CJe o si los niveles de PrPsc fuera del SNC están por encima del umbral de detección del ensayo sólo en algunos pacientes con CJe.

Diagnósticos moleculares complementarios con marcadores distintos de PrPsc

Varios esfuerzos se han hecho para identificar transcritos y proteínas que se encuentren aumentados en casos afectados vs. controles sanos (ani-

males o líneas celulares) en las etapas avanzadas de la enfermedad^{42,43,44}. Idealmente estos marcadores deberían ser detectables (por expresión diferencial) en sangre u orina. Marcadores útiles en el marco clínico adecuado son: S-100; la enolasa neuro-específica (NSE) y 14-3-3. Estas proteínas son marcadores de daño neuronal subagudo presentes en fluidos como el LCR, pero no indicadores exclusivos de estas patologías sino de varios desórdenes neurodegenerativos^{45,46}. Por ejemplo, existen falsos positivos para 14-3-3 en LCR en pacientes con encefalitis infecciosa viral, bacteriana y tuberculosa, encefalopatía metabólica o tóxica, daño cerebral por hipoxia, accidente cerebro vascular, Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal / ELA con demencia, hemorragia subaracnoidea, demencia vascular, tumores de cerebro, metástasis, carcinomatosis meníngea, encefalopatía paraneoplásica / límbica / cerebelosa, esclerosis múltiple, encefalopatía de Hashimoto⁴⁷.

14-3-3 en el diagnóstico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.

14-3-3 es un marcador de daño neuronal subagudo, útil en el contexto clínico de CJ. Este *test* no es diagnóstico de certeza ni para CJe ni para CJv. 14-3-3 es una familia de proteínas ubicua, con algunas isoformas particulares específicas de las neuronas. Estas isoformas están involucradas en señales intracelulares y presentes en alta concentración en el SNC, pueden ser liberadas en el LCR en varias condiciones neuropatológicas que afecten la integridad neuronal, por lo tanto su presencia en el LCR no es exclusiva de las EETs, de ahí la importancia de ordenar el *test* sólo en el marco clínico adecuado. En el contexto clínico de CJ, la detección de 14-3-3 en LCR tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de CJe y es menos sensible en los casos de CJv (sensibilidad: 48% y especificidad: 91%⁴⁸). Con respecto al CJ esporádico, la OMS y el programa Europeo para la Vigilancia de la ECJ han incluido este ensayo, el 14-3-3 positivo en LCR por Western Blot o Elisa, entre los criterios diagnósticos, y permite reclasificar un caso *posible* como *probable*. En pacientes que tienen demencia progresiva de menos de dos años de duración y otros criterios de CJ *posible*, un LCR positivo para 14-3-3 tiene un peso diagnóstico igual al del EEG específico en CJe. Afortunadamente, la proteína parece ser

estable a temperatura ambiente por períodos prolongados y las muestras pueden ser fácilmente enviadas por correo hacia los Centros de Referencia para ser analizadas.

14-3-3 positivo en LCR, en pacientes con clínica compatible, es un resultado que sostiene la presunción pero no la confirma, mientras que un resultado negativo no la excluye. Hay evidencia que sugiere que 14-3-3 positivo en LCR es más factible de encontrar en las etapas intermedias de la enfermedad, no obstante, esto no debería condicionar el momento de la punción lumbar ya que 14-3-3 se ha detectado en todas las fases de la enfermedad.

El análisis de 14-3-3 en LCR implica ciertas habilidades técnicas e interpretativas y la OMS recomienda enfáticamente que las muestras sean enviadas a alguno de los Centros de Referencia listados entre los que se encuentra el laboratorio de neuropatología de FLENI⁴⁹.

La siguiente tabla compara sensibilidades y especificidades del *Western Blot* de 14-3-3 como marcador de daño neuronal en el contexto clínico de CJ.

Western Blot 14-3-3 (LCR)

Creutzfeldt-Jakob esporádico

Estudio	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)
Poser y col (n=289)	93%	95%
Hsicht y col (n=165)	96% (n=94)	96% (n=71)
Zerr y col (n=298)	93% (n=134)	94% (n=164)
Beaudry y col	100%	90%
Collins y col	92%	91%
Lemstra y col (n=110)	87% (n=77)	97% (n=33)
Serie FLENI (n=231)	88.4% (84/95)	95.6% (130/136)

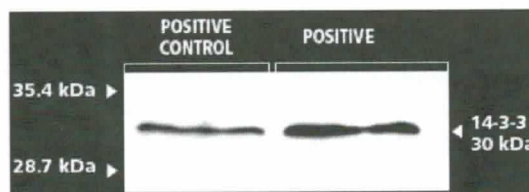
Creutzfeldt-Jakob genético (OMS, 2003)

ECJf (general)	50%
E200K (n=16)	100%

Creutzfeldt-Jakob variante (ECJv)

Green y col ECJv (n=34)	22/34
-------------------------	-------

La siguiente autoradiografía ilustra un *Western Blot* de 14-3-3 en LCR, calle 1: caso control positivo, calle 2: caso incógnita que resultó positivo.



Otros diagnósticos complementarios desde diferentes enfoques técnicos

Tampoco se debe olvidar que no hay un consenso absoluto en la naturaleza del agente transmisor y que PrPsc mismo tal vez sea un marcador alternativo en las enfermedades priónicas⁵⁰. El *gold standard* diagnóstico experimental para estas patologías se realiza infectando ratones con diluciones seriadas de homogenatos de cerebro infectivos, con la consecuente inversión en tiempo y animales, aunque ahora se han desarrollado clones celulares neuronales con alta susceptibilidad que acortan significativamente tiempos, costos y el proceso es automatizable⁵¹. Estos ensayos tal vez sean un adelanto de las metodologías futuras pero hasta ahora solo han sido usadas con inóculos de ratones.

Durante mucho tiempo el EEG característico fue el método elegido para el diagnóstico de CJ *probable*, pero como su sensibilidad es limitada ha sido muy cuestionado.

El hallazgo de patrones específicos basados en las técnicas de imágenes por resonancia magnética (MRI) asociados a estas enfermedades se ha afianzado en los últimos años y puede constituir un elemento adicional para el diagnóstico de CJ.

El EEG en el diagnóstico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.

Un EEG con complejos periódicos tri- o bifásicos de 1 a 2 Khz. es un hallazgo característico en los casos de CJ esporádico, y ha sido descrito con una sensibilidad de 66% y especificidad de 74%⁵². Si bien este patrón no se consideraba característico de casos con CJ variante⁵³, recientemente en un caso japonés y otros en el Reino Unido ha sido reconocido en etapas avanzadas de la enfermedad (comunicación personal, Dr. Robert Will), y se su-

giere efectuar EEGs seriados. Es necesario recordar que el EEG periódico incluso en casos sospechosos de CJ esporádico no es diagnóstico y puede observarse en otras patologías.

Las imágenes por resonancia magnética en el diagnóstico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles.

Las técnicas de neuroimágenes, en particular de resonancia magnética, se han perfeccionado y pueden ser muy útiles para detectar casos con clínica de CJe incluso, distinguir casos de CJv de CJe³³. En el 90% de los casos de CJv está presente el llamado "signo del pulvinar", una señal simétrica hiperintensa característica en el tálamo posterior en secuencia T-2 de la resonancia magnética, con una sensibilidad de 90%³⁴. La especificidad de estos cambios alcanza al 95% en los casos consistentes con CJv. Este signo es por ahora el mejor *test* no-invasivo *in vivo* para CJv, si bien aún no ha sido incorporado a los criterios de definición de caso.

En el CJe se observa una hiperintensidad en el núcleo caudado y putamen en la secuencia T-2. Las secuencias de DIFUSION y FLAIR, que detectan cambios corticales precoces, tienen asociadas una alta sensibilidad y especificidad. Estas técnicas son relativamente no invasivas y permiten corroborar la sospecha de la presentación clínica de ECJ en humanos.

El rol más importante de las neuroimágenes es excluir otras patologías. La resonancia magnética también puede mostrar atrofia cerebral, la cual tiende a aumentar con la duración de la enfermedad. Aunque la mayoría de las imágenes no muestran anomalías focales, un estudio retrospectivo sugiere que el 80% tiene señal aumentada en los ganglios basales en T-2 y en imágenes de densidad protónica, generalmente simétricas. Otras patologías que pueden dar anomalías similares en los ganglios de la base son la enfermedad de Wilson y citopatías mitocondriales.

El signo del pulvinar se observa mejor en las imágenes axiales pero también en otros planos. Está descrito en las secuencias T-2, densidad protónica, FLAIR y Difusión pero no en T-1.

La atrofia difusa se observa en la mayoría de los pacientes con CJe, en contraste con los afectados con CJv incluso en etapas avanzadas³⁵.

Recomendaciones de la OMS para la clasificación de caso CJ

CJ esporádico

Caso Definido

Con confirmación por técnicas de neuropatológica (biopsia o autopsia); y/o inmunohistoquímica y/o presencia de PrP resistente a proteasas confirmada por Western Blot y/o presencia de fibrillas asociadas a scarpie (SAF)

Caso Probable

Demencia rápidamente progresiva con por lo menos 2 de las siguientes características clínicas:
 Mioclonías
 Disturbios Visuales y/o cerebelosos
 Signos de disfunción piramidal/extrapiramidal
 Mutismo akinético

y

EEG característico aparecido durante el curso de la enfermedad y/o 14-3-3 positivo en LCR y una duración no mayor de dos años al deceso. Otras investigaciones de rutina no deben sugerir otros diagnósticos alternativos

Caso Posible

Demencia rápidamente progresiva con por lo menos 2 de las siguientes características clínicas:
 Mioclonías
 Disturbios Visuales y/o cerebelosos
 Signos de disfunción piramidal/extrapiramidal
 Mutismo akinético

y

Sin EEG o con EEG pero no típico; ni 14-3-3 positivo en LCR
 Enfermedad con duración menor de 2 años.

CJ iatrogénico

Síndrome cerebelar progresivo en un paciente receptor de hormona pituitaria cadavérica; o ECJ esporádico con un riego de exposición reconocido, por ejemplo, el trasplante de duramadre o cornea.

CJ genético

Con relación a la Vigilancia incluye casos de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e Insomnio Fatal Hereditario (IFH). Casos definidos o probables de ECJ con algún familiar directo con ECJ definido o probable.

CJ variante

Definido: por confirmación neuropatológica de CJv y desorden neuropsiquiátrico progresivo (1.a).

- Probable:* 1. y 4/5 de 2. y 3.a. y 3.b. ó 1 y 4.a.
Posible: 1. y 4/5 de 2. y 3.a.
 1.a. Trastorno neuropsiquiátrico progresivo
 1.b. Duración clínica mayor a 6 meses
 1.c. Sin diagnóstico alternativo por estudios de rutina
 1.d. Sin antecedente de exposición iatrogénica
 1.e. Sin evidencia de EET familiar
 2.a. Síntomas psiquiátricos precoces
 2.b. Síntomas sensoriales dolorosos persistentes
 2.c. Ataxia

- 2.d. Mioclonías o Corea o Distonía
 2.e. Demencia
 3.a. EEG** sin descargas periódicas (o sin efectuar)
 3.b. RMN con hiperintensidad bilateral en el pulvinar en T2 o en densidad protónica.
 4.a. Biopsia de amígdala positiva

** Actualmente se sabe que el EEG puede ser periódico

REFERENCIAS

- 1 Griffith, J.S. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature*. 215:1043-1044.
- 2 Prusiner SB. Prions. Nobel Lecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. 95:13363-13383.
- 3 Kellings K, Meyer N, Mirenda C, et al. Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch Virol Suppl*. 1993;7:215-25
- 4 Jiri G, Safar, Klaus Kellings, Ana Serban, et al. Search for a Prion-Specific Nucleic Acid. *JOURNAL OF VIROLOGY*. 2005;79:10796-10806.
- 5 Prusiner, S.B., Groth, D.F., McKinley, M.P., et al. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1981. 78:4606-4610.
- 6 Millson G C, Hunter G D, Kimberlin R H. The physico-chemical nature of the scrapie agent. *Frontiers in Biology*. 1976. 44:243-266.
- 7 Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., et al. 1989. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 338:342-345.
- 8 McKinley, M.P., Bolton, D.C., Prusiner, S.B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*. 1983. 35:57-62.
- 9 Büeler, H.R., Aguzzi, A., Sailer, A., et al. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-1347.
- 10 Zijlstra, M., Bix, M., Simister, N.E., et al. 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature*. 1990. 344:742-746.
- 11 Büeler, H.R., Fischer, M., Lang, Y., et al. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-582.
- 12 Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*. 1994. 370:295-297.
- 13 Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*. 1996. 380:639-642.
- 14 Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., et al. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J. Exp. Med*. 2003. 198:5-17.
- 15 Manson JC et al. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*. 1994. 8:121-127.
- 16 Aguzzi, A., Hardt, W.O. Dangerous liaisons between a microbe and the prion protein. *J. Exp. Med*. 2003. 198:1-4.
- 17 Büeler, H.R., Aguzzi, A., Sailer, A., et al. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-1347.
- 18 Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., et al. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*. 1994. 77:967-968.
- 19 Popper, K. (1991). Selections from the logic of scientific discovery. In *The Philosophy of Science*, R. Boyd, P. Gasper, J.D. Trout, eds. (Cambridge, MA: The MIT Press), pp. 100-119.
- 20 Erandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., et al. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*. 1996. 379:339-343.
- 21 Aguzzi, A. Grafting mouse brains: from neurocarcinogenesis to neurodegeneration. *EMBO J*. 1998. 17:6107-6114.
- 22 Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*. 2001. 411:810-813.
- 23 Paula Saá, Joaquín Castilla, and Claudio Soto. Ultra-efficient Replication of Infectious Prions by Automated Protein Misfolding Cyclic Amplification. *J. Biol. Chem*. 2006. 281:35245-35252.
- 24 Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*. 2005. 121:195-206.

- 25 Liebman SW. Progress toward an ultimate proof of the prion hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99:9098-100.
- 26 Steinhoff BJ, Zerr I, Glatting M, et al. Diagnostic value of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. 2004. 56:702-8.
- 27 Alperovitch A, Brown P, Weber T, et al. Incidence of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe in 1993. *Lancet*. 1994. 343:918.
- 28 Brown P, Cathala F, Castaigne P, et al. Creutzfeldt-Jakob disease: clinical analysis of a consecutive series of 230 neuropathologically verified cases. *Ann Neurol*. 1986. 20:597-602.
- 29 WHO manual for Strengthening Diagnosis and Surveillance of Creutzfeldt-Jakob Disease. 1998. p. 6.
- 30 Parchi P, Giese A, Capellari S, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol*. 1999. 46:224-33.
- 31 Peden et al. 2004. Preclinical vCJD after blood transfusion in a Prnp codón 129 heterozygous patient. *Lancet* 364:527-529.
- 32 Zhang Y, Swietnicki W, Zagorski MG, et al. Solution structure of the E200K variant of human prion protein. *J Biol Chem*. 2000 275:33650-4
- 33 Hsiao KK, Groth D, Scott M, et al. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91:9126-30
- 34 Lasmezas CI, Deslys JP, Robain O, et al. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*. 1997. 275:402-5.
- 35 Kitamoto T, Iizuka R, Tateish. An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Straussler syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993. 192:525-31.
- 36 Glatzel M, Abela E, Maissen M, et al. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*. 2003. 349:1812-20.
- 37 Hill, AF., Butterworth, A.J., Joiner, S., et al. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*. 1999. 353:183-189.
- 38 Hill, AF., Zeidler, M., Ironside, J., et al. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet*. 1997. 349:99.
- 39 Hilton, D.A., Fathers, E, Edwards, P., et al. Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 1998. 352:703-704
- 40 Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, et al. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*. 2003. 348:711-9.
- 41 Korth C, Stierli B, Streit P, et al. Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*. 1997. 390:74-7.
- 42 Duguid, J.R., and Dinauer, M.C. 1990. Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res*. 18:2789-2792.
- 43 Duguid, J., and Trzepacz, C. Major histocompatibility complex genes have an increased brain expression after scrapie infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1993. 90:114-117.
- 44 Dandoy-Dron, F., et al. 1998. Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J. Biol. Chem*. 273:7691-7697.
- 45 Hsich G, Kenney K, Gibbs CH, et al. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med*. 1996. 335:924-930.
- 46 Beaudry, P., et al. 14-3-3 protein, neuron-specific enolase, and S-100 protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord*. 1999. 10:40-46.
- 47 Zerr, I., et al. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol*. 1998. 43:32-40.
- 48 Green AJ, Thompson EJ, Stewart GE, et al. Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001. 70:744-8.
- 49 WHO manual for Strengthening Diagnosis and Surveillance of Creutzfeldt - Jakob disease. 1998.
- 50 Aguzzi, A., and Weissmann, C. Prion research: the next frontiers. *Nature*. 1997. 389:795-798.
- 51 Klohn, P.C., Stoltze, L., Flechsig, E., et al. A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003. 100:11666-11671.
- 52 Zerr I, Pocchiari M, Collins S, et al. Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 2000. 55:811-5.
- 53 Tribl, G.G., et al. Sequential MRI in a case of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroradiology*. 2002. 44:223-226.
- 54 Zeidler, M., Collie, D.A., Macleod, M.A., et al. FLAIR MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 2001. 56:282.