

Nuevas herramientas moleculares para la detección de priones en muestras biológicas de pacientes con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

Choreño-Parra José Alberto¹, Carnalla-Cortés Martha¹, Martínez-Zúñiga Nayeli¹, Luna-Muñoz José C², Guadarrama-Ortíz Parménides³.

¹DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN, CENTRO ESPECIALIZADO EN NEUROCIRUGÍA Y NEUROCIENCIAS MÉXICO (CENNM), CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.

²BANCO NACIONAL DE CEREBROS, LABORATORIO NACIONAL DE SERVICIOS EXPERIMENTALES (LANSE), CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV), INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.

³DEPARTAMENTO DE NEUROCIRUGÍA, CENTRO ESPECIALIZADO EN NEUROCIRUGÍA Y NEUROCIENCIAS MÉXICO (CENNM), CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.

Artículo de Revisión

Correspondencia

Dr. Parménides Guadarrama Ortíz, Departamento de Neurocirugía, Centro Especializado en Neurocirugía y Neurociencias México (CENNM), Manzanillo y Tlaxcala 94, Roma Sur, C.P. 06760, Ciudad de México, México.

E-mail: dr.guadarrama.ortiz@cenm.com

Recibido 06-mayo-2018
Aceptado 06-septiembre-2018
Publicado 10-octubre -2018

Resumen

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es una encefalopatía espongiiforme invariablemente mortal caracterizada por demencia rápidamente progresiva. Constituye un reto diagnóstico dada su rareza y sus manifestaciones neurológicas inespecíficas, las cuales se relacionan con la pérdida global de tejido nervioso secundaria a la acumulación tóxica de la proteína priónica en el cerebro. Su confirmación definitiva depende del análisis histopatológico de biopsias o autopsias y generalmente se realiza de forma post-mortem. No obstante, es de vital importancia la identificación temprana de los casos de este padecimiento para diferenciarlos de otras formas tratables de deterioro cognitivo agudo y prevenir su transmisión iatrogénica. Actualmente se emplean diversos marcadores electrofisiológicos, imagenológicos y moleculares para mejorar el diagnóstico pre-mortem de la enfermedad. Sin embargo, estas pruebas tienen baja sensibilidad. Dada la urgente necesidad de estudios que permitan la detección de priones *in vivo*, se han desarrollado técnicas moleculares que logran dicho propósito con alta sensibilidad y especificidad, constituyendo una nueva oportunidad para mejorar el diagnóstico y vigilancia de ésta y otras formas de encefalopatías espongiiformes. El objetivo de la presente revisión narrativa es proveer una actualización de las nuevas herramientas moleculares para la detección de priones en muestras biológicas de pacientes con sospecha de encefalopatía espongiiforme.

Palabras clave: Priones, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia, encefalopatías espongiiformes.

2018, Choreño-Parra JA, et. al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Creative Commons Attribution License CC BY 4.0 International NC, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite el autor original y la fuente.

Review article

Novel molecular tools for the detection of prion protein in biological samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease

Abstract

Creutzfeldt-Jakob disease is an invariably fatal spongiform encephalopathy characterized by rapidly progressive dementia. It constitutes a diagnostic challenge because of its rarity and unspecific neurological findings that are related with a global loss of nervous tissue secondary to the toxic accumulation of prion protein within the brain. Its definitive confirmation relies on the histopathological analysis of brain biopsies or autopsies and it is generally performed post-mortem. Nonetheless, early identification of cases of this disease is of major relevance to distinguish them from other treatable forms of acute cognitive decline and to prevent iatrogenic transmission. Currently, several electrophysiological, imaging and molecular markers are being used to improve the pre-mortem diagnosis of this disease. However, such markers have a low sensitivity. Due of the urgent need of studies that allow to detect prions *in vivo*, novel molecular techniques that achieve this purpose with high sensitivity and specificity have been developed recently, constituting a new opportunity to improve the diagnosis and surveillance of this and other forms of spongiform encephalopathies. Thus, the aim of this narrative review is to provide an update of new molecular tools used for detection of prions in biological samples from patients with suspected spongiform encephalopathy.

Keywords: Prion, Creutzfeldt-Jakob disease, dementia, spongiform encephalopathies.

Introducción

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) es la forma más frecuente entre las encefalopatías espongiformes que afectan a los humanos. Este grupo de enfermedades, que incluye también al síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el insomnio familiar fatal (FFI), la enfermedad de kuru y la recientemente descrita prionopatía

con sensibilidad variable a proteasa (VPSPr), se caracterizan por un deterioro cognitivo rápidamente progresivo acompañado de otros trastornos neurológicos multifocales piramidales, extrapiramidales, visuales, cerebelares y psiquiátricos, que llevan a la muerte a los sujetos enfermos en un periodo corto de tiempo¹⁻³. Las

manifestaciones clínicas tan floridas se deben a la pérdida global de tejido nervioso secundaria a la acumulación tóxica de una proteína mal plegada llamada "proteína priónica" (PrP^{Sc}) dentro del cerebro⁴.

La incidencia global de CJD es de un caso por millón de habitantes al año⁵. Sin embargo, es probable que existan muchos casos no identificados debido a la gran variabilidad clínica de este padecimiento y a que la confirmación del diagnóstico en un sujeto vivo requiere la obtención de una biopsia de tejido cerebral para su análisis histopatológico, un procedimiento que no siempre se encuentra justificado dado que no aporta un beneficio al pobre pronóstico de los pacientes con dicho padecimiento⁶. Por tal motivo, el diagnóstico definitivo de esta enfermedad se realiza frecuentemente de forma post-mortem. No obstante, es fundamental realizar una identificación temprana de la CJD para diferenciarla de otras causas tratables de demencia rápidamente progresiva⁷. Para dicho propósito se han empleado varios biomarcadores electrofisiológicos, imagenológicos y moleculares con el fin de sustentar el diagnóstico pre-mortem de CJD. Entre ellos destacan hallazgos específicos en el electroencefalograma (EEG), en las imágenes de Difusión por Resonancia Magnética Nuclear (DWI), así como la medición de las concentraciones de algunas moléculas en el líquido cefalorraquídeo (CSF) como la enolasa neuronal específica (NSE), la proteína tau (T-tau) y la proteína 14-3-3⁸. El mayor problema del uso de estos marcadores es que tienen una alta especificidad pero una baja sensibilidad y los hallazgos provistos por estas pruebas también pueden ser observados como resultado de otros trastornos neurológicos⁸.

En este contexto, ha surgido una creciente necesidad por contar con estudios y herramientas diagnósticas que permitan la identificación *in vivo* de la proteína PrP^{Sc} en muestras biológicas de pacientes con CJD, con el fin de tener un alto grado de certeza acerca del diagnóstico y poder establecer medidas terapéuticas y preventivas

en el paciente vivo, así como para otorgar un buen asesoramiento médico a sus familiares. Los esfuerzos recientes han resultado en el desarrollo de nuevas tecnologías moleculares que permiten detectar cantidades mínimas de PrP^{Sc} en muestras obtenidas de diversos sitios anatómicos para confirmar el diagnóstico pre-mortem de CJD con una alta sensibilidad y especificidad. El objetivo de la presente revisión narrativa es abordar de manera general los aspectos clínicos y moleculares más relevantes de la enfermedad y discutir la utilidad de las nuevas herramientas para su uso en el contexto clínico, las cuales sin duda tendrán una gran influencia y marcarán una nueva era en el diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de ésta y otras formas de encefalopatías espongiformes humanas.

El espectro clínico-molecular de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es una condición única que puede ocurrir como una patología esporádica (sCJD), familiar (fCJD), contagiosa (vCJD) o iatrogénica (iCJD), dependiendo del mecanismo subyacente¹. Cada una de éstas formas posee sus propias características clínicas que difieren especialmente en la edad a la que se presentan las manifestaciones neurológicas y en el tiempo entre el inicio de los síntomas y la muerte. La forma esporádica es responsable del 85 a 90% de todos los casos de CJD⁵. Esta variante es resultado de la aparición espontánea y la acumulación de la proteína PrP^{Sc} en el cerebro lo cual causa muerte neuronal y pérdida de tejido cerebral en diferentes áreas del encéfalo⁹. Dicha proteína es una versión anómala de la proteína priónica normal (PrP^C) que adopta un plegamiento alternativo⁴.

La PrP^C es una proteína de 209 aminoácidos que está anclada a la superficie de las neuronas mediante un enlace al fosfolípido de membrana glicofosfatidilinositol, en donde juega un importante papel en varias funciones celulares¹⁰. El gen de PrP^C, denominado PRNP, se encuentra en el cromosoma 20 y su secuencia genética determina que dicha proteína normalmente tenga una

estructura caracterizada por una región C-terminal rica en α -hélices, proveyéndole las características fisicoquímicas de ser monomérica, soluble y sensible a proteasas^{11,12}. Sin embargo, diversas alteraciones presentes en las diferentes formas clínicas de CJD conducen a la proteína PrP^C a adquirir un plegamiento anómalo convirtiéndose en PrP^{Sc}, la cual se caracteriza por una ganancia de estructuras de láminas β ¹². En los casos de fCJD se conoce que un amplio rango de mutaciones autosómicas dominantes en el gen PRNP hace más susceptible a la proteína PrP^C a adquirir un plegamiento alternativo, mientras que en las formas iCJD y vCJD, la proteína priónica anormal PrP^{Sc} se transmite de persona a persona a través del consumo de alimentos contaminados o la exposición iatrogénica a tejido nervioso infectado^{13,14}, respectivamente. Una vez en el cerebro, PrP^{Sc} induce su propia replicación y propagación al servir de molde para la conversión y mal plegamiento de PrP^C¹². Por otro lado, en el caso específico de la forma esporádica de CJD se desconoce la causa de la conversión espontánea de PrP^C en PrP^{Sc}, pero un fallo en los mecanismos que controlan el plegamiento de las proteínas podría estar implicado¹⁵. El proceso que lleva a la pérdida de tejido cerebral se relaciona por un lado con el efecto tóxico directo de los agregados amiloideos de PrP^{Sc} en las neuronas y en segundo lugar a la pérdida de las funciones normales que desempeña la proteína PrP^C¹⁶.

Clínicamente la mayoría de los pacientes con CJD, especialmente con la forma esporádica, se presentan con la triada compuesta por demencia rápidamente progresiva, mioclonías y descargas periódicas en el EEG. Sin embargo, un amplio rango de características clínicas pueden estar presentes al inicio de la enfermedad incluyendo signos piramidales, extrapiramidales, ataxia, signos cerebelares, síntomas psiquiátricos, alteraciones visuales, desórdenes del sueño, síntomas sensoriales y un deterioro cognitivo que culmina en un estado de mutismo acinético. Dependiendo de la manifestación neurológica más prominente varias formas clínicas de sCJD han sido descritas, entre ellas la forma visual (de Heidenhain), talámica,

cerebelar o atáxica, mioclónica, amiotrófica y panencefálica¹⁷⁻²¹. Recientemente se ha podido relacionar dicha variabilidad clínica con aspectos genéticos y moleculares de la proteína PrP^{Sc}. De hecho, hoy en día se sabe que polimorfismos de metionina (M) y valina (V) en el codón 129 del gen PRNP, junto con el estado de glucosilación de dicha proteína, identificado por sus varios patrones diferentes de movilidad en geles de electroforesis después de su digestión con proteasas (patrones tipo 1 a 4), ayudan a clasificar a los pacientes en diversos fenotipos que se correlacionan en cierto grado con las variables clínicas descritas en el pasado. Para hacer más fácil el estudio de la enfermedad dichos fenotipos han sido agrupados en tres grandes categorías: a) formas cognitivas de sCJD (MM1, MV1, MM2, VV1); b) formas atáxicas de sCJD (VV2, MV2); c) otros tipos no CJD (patrones de movilidad 3 y 4 para insomnio esporádico fatal [sFI] y VPSP, respectivamente)^{3, 22-28}. Lo anterior revela que las diferentes clases de PrP^{Sc} determinadas por polimorfismos genéticos y patrones de glucosilación causan alteraciones neurológicas distintas, es decir, el fenotipo del sujeto depende en cierto grado de la estructura molecular de la proteína PrP^{Sc} implicada, lo cual justifica y hace indispensable la caracterización molecular de cada caso.

Abordaje diagnóstico actual

La identificación de un individuo con alguna forma de CJD sigue siendo un reto diagnóstico debido a su baja incidencia, lo cual genera un pobre grado de sospecha entre los médicos. Así mismo, las manifestaciones clínicas tan inespecíficas pueden llevar al clínico a confundir el cuadro con otros desórdenes neurológicos que también se caracterizan por un deterioro cognitivo rápidamente progresivo, incluyendo la demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, meningoencefalitis viral, bacteriana, parasitaria o autoinmune (por ejemplo encefalitis de Hashimoto, encefalitis límbica), degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, encefalomiелitis paraneoplásica y demencia vascular⁷. De la misma

manera, algunas variantes de la enfermedad de Alzheimer pueden progresar de forma rápida y ser confundidas con CJD²⁹. Además, un aspecto que dificulta aún más el diagnóstico clínico es el hecho de que se trata de un trastorno que puede ocurrir en diferentes formas como se mencionó antes, y que incluso la sCJD ha sido categorizada en diferentes fenotipos, cada uno con sus propias características específicas, las cuales difieren en la edad al inicio de la enfermedad, la duración de la misma, los hallazgos neurológicos más prominentes e incluso la sensibilidad de algunas herramientas diagnósticas para detectar dichos fenotipos¹.

El abordaje inicial para un paciente con probable CJD debe ser similar al empleado para valorar a cualquier individuo con deterioro cognitivo y debe incluir un interrogatorio completo investigando antecedentes de cuadros similares en familiares de primer grado, alcoholismo, toxicomanías y antecedentes de exposición laboral a sustancias neurotóxicas o metales pesados, antecedentes personales de insuficiencias renal, hepática, eventos vasculares cerebrales, conductas de riesgo para adquirir la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y convivencia con animales. Lo anterior debe ser seguido por un examen físico general y neurológico así como una evaluación neuropsicológica aplicando pruebas cognitivas validadas, aunque muchos pacientes con CJD acuden en un estado tan grave de deterioro cognitivo que la mayoría de las veces no es posible realizar dicha evaluación. Los estudios iniciales de laboratorio deben ayudar a descartar otras causas de deterioro cognitivo incluyendo biometría hemática, pruebas de función tiroidea, hepática y renal, pruebas para detectar infección por VIH, niveles séricos de vitaminas B, folatos, estudios toxicológicos, pruebas moleculares y microbiológicas en LCR para descartar neuroinfección, así como reactantes de fase aguda

y auto-anticuerpos para evaluar la posibilidad de autoinmunidad³⁰.

Las imágenes cerebrales son fundamentales para descartar enfermedad cerebrovascular, metástasis cerebrales o tumores primarios del sistema nervioso central. La resonancia magnética nuclear (RMN) es una prueba de gran utilidad y ha mostrado ser el mejor estudio diagnóstico para la identificación clínica pre-mortem de un sujeto con CJD, especialmente aquellos con la forma esporádica. Dicho valor diagnóstico de la RMN es debido a las mejoras recientes en las imágenes por DWI, en las cuales se deben observar al menos tres hiperintensidades no contiguas en la corteza cerebral o los núcleos basales^{31,32}. Así mismo, un compromiso del tálamo posterior apoya el diagnóstico de vCJD (signo del pulvinar)³³. Por otro lado, el EEG muestra complejos punta-onda trifásicos periódicos (PSWC) con actividad lenta difusa de fondo, los cuales son observados con más frecuencia en individuos con sCJD en sus etapas intermedias a tardías³⁴.

De la misma forma, se han empleado los niveles en LCR de las proteínas NSE, T-tau y 14-3-3 como biomarcadores para mejorar la precisión del diagnóstico pre-mortem de CJD⁸. El fundamento de su uso es que al ser proteínas intracelulares que se liberan al medio extracelular con la pérdida de la integridad de la membrana neuronal, un aumento en sus concentraciones en el LCR podrían traducir daño neuronal (ver Figura 1), aunque un problema importante es que las elevaciones en los niveles de dichos biomarcadores pueden ocurrir de forma inespecífica y por diferentes causas que condicionen muerte de neuronas. Es por ello que su valor radica en su empleo en los contextos clínicos correctos. Además, estos biomarcadores tienen una alta especificidad pero baja sensibilidad y su utilidad puede diferir incluso dependiendo de la variante clínica de CJD⁸. Ésta es la misma situación para los hallazgos descritos en la DWI.

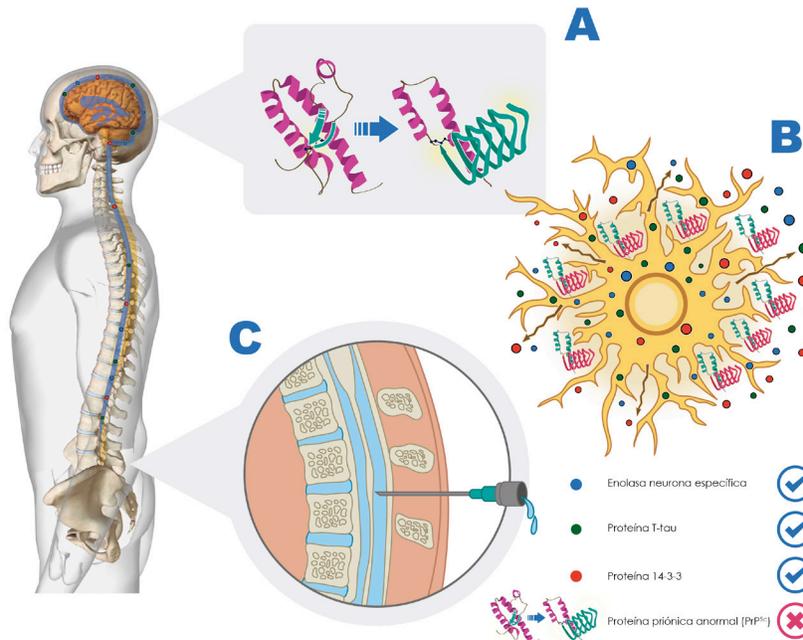


Figura 1. Bases moleculares del uso de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo LCR para el diagnóstico de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

A) La conversión de PrP^C en la forma mal plegada PrP^{Sc} dentro del cerebro lleva a la acumulación tóxica de ésta última, causando la pérdida de tejido nervioso en distintas regiones del cerebro. B) Las neuronas en proceso de muerte liberan al medio extracelular diferentes proteínas estructurales y funcionales que se acumulan en el LCR. C) Las diferentes moléculas liberadas hacia el LCR, entre las que se encuentran la enolasa neuronal específica, la proteína T-tau y la proteína 14-3-3, son empleadas como biomarcadores indirectos de muerte neuronal y en el contexto de signos y síntomas sugestivos de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob un incremento en su concentración en LCR por encima de un punto de corte específico puede apoyar el diagnóstico. No obstante, una limitación de éste enfoque es que no permite detectar de forma directa a la proteína PrP^{Sc} y que pueden ocurrir elevaciones inespecíficas de los biomarcadores empleados de forma secundaria a otras causas de pérdida de neuronas.

La confirmación definitiva de CJD requiere forzosamente la demostración de la presencia de la proteína PrP^{Sc} en el sistema nervioso central asociada a cambios neuropatológicos como astrogliosis, pérdida neuronal, degeneración esponjiforme y vacuolización del neuropilo, lo cual se realiza frecuentemente mediante análisis histopatológico,

inmunohistoquímico y Western blot de tejido cerebral obtenido de biopsias o autopsias cerebrales⁶. No obstante, para mejorar la vigilancia epidemiológica de la misma, y dada la creciente disponibilidad de las pruebas diagnósticas mencionadas previamente, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) han modificado criterios diagnósticos que

fueron empleados para clasificar cada caso de acuerdo al grado de probabilidad de enfermedad basados en las características clínicas y los resultados de otros estudios de laboratorio^{35,36}. Lo anterior ha brindado la oportunidad a los clínicos de realizar mejores abordajes diagnósticos y clasificación de los sujetos con sospecha de padecer CJD.

En la [tabla 1](#) se muestra la sensibilidad y especificidad de los diferentes biomarcadores electrofisiológicos, imagenológicos y moleculares utilizados en la valoración de pacientes con CJD⁶. Así mismo, en la [tabla 2](#) se enlistan los criterios diagnósticos modificados de los CDC³⁶.

Tabla 1. Sensibilidad y Especificidad de los biomarcadores de CJD.

| Biomarcador | Sensibilidad (%) | Especificidad (%) |
|--------------------------------|------------------|-------------------|
| PSWC en el EEG | 64 | 91 |
| Proteína 14-3-3 en LCR | 50 | 98 |
| NSE en LCR | 53 | 98 |
| T-tau en LCR | 68 | 95 |
| RMN | 98 | 94 |
| 14.3.3 + T-tau en LCR | 49 | 98 |
| NSE + T-tau en LCR | 49 | 98 |
| 14-3-3 + NSE en LCR | 42 | 98 |
| *ELISA ultrasensible en sangre | 71 | 100 |
| PQ-CSF | 87-97 | 100 |
| IQ-CSF | 97-100 | 100 |

*Utilidad demostrada únicamente en muestras de sangre de sujetos con vCJD.

Nuevas herramientas moleculares para detectar la proteína PrP^{Sc} *in vivo*

ELISA ultrasensible para detectar PrP^{Sc} en sangre

Dada la escasez de técnicas para detectar *in vivo* la presencia de la proteína PrP^{Sc} en muestras biológicas de pacientes con CJD, se han realizado diversos esfuerzos alrededor del mundo para desarrollar nuevas herramientas diagnósticas que permitan lograr dicho objetivo de una manera poco invasiva, ya que por largo tiempo se ha dependido de la disponibilidad de tejido cerebral para su análisis por técnicas inmunológicas el cual debe ser obtenido por biopsia. Aunque las mayores concentraciones de dicha proteína que permiten su detección por métodos convencionales se

encuentran únicamente en el cerebro o LCR, existe evidencia que revela una distribución variable de PrP^{Sc} en otros tejidos y fluidos distales al sistema nervioso central, destacando la sangre especialmente en casos de vCJD³⁷. Ésta forma de CJD es un problema de salud importante en regiones donde inicialmente se adquirió la enfermedad por el contacto con la encefalopatía espongiforme bovina, y desde fechas recientes, existe preocupación por la posible transmisión de vCJD a través de transfusiones de sangre y sus derivados³⁸⁻⁴¹, por lo que se requiere un método sensible que permitan detectar la presencia del agente infeccioso en sujetos potencialmente portadores de la enfermedad. Sin embargo, una limitante para la identificación de muestras

de sangre contaminadas con priones es la baja concentración de PrP^{Sc} y la mayor disponibilidad de PrP^C en dicho fluido, lo que puede llevar a resultados falsos negativos o bien a falsos positivos por la reacción cruzada de la proteína priónica normal en pruebas inmunoquímicas, respectivamente.

De forma convencional, la mayoría de los inmunoensayos emplean muestras biológicas pre-tratadas con proteasas para eliminar el ruido de fondo asociado a la presencia de PrP^C, disminuyendo la reactividad cruzada⁴². Sin embargo, también se sabe que la proteína patogénica PrP^{Sc}, a diferencia de su contraparte normal, tiene una capacidad aumentada de unirse a la superficie de ciertos metales con gran afinidad^{43,44}. En este contexto, un grupo de investigadores liderados por Jackson GS, ha aprovechado dicha propiedad para generar un inmunoensayo de absorción ligado a enzimas (ELISA) con capacidad para detectar la proteína PrP^{Sc} en un rango de sensibilidad de varios ordenes de magnitud menor a otros ensayos^{45,46}. Dicho enfoque se basa en la captura y enriquecimiento de la proteína anormal en sangre periférica usando una matriz sólida de captura optimizada a base de partículas de acero, que fue resultado de una investigación extensiva de un rango amplio de superficies de unión potenciales, con el objetivo de evitar la necesidad de tratamientos proteolíticos. El protocolo después de la captura de la PrP^{Sc} en la matriz de acero es similar al de cualquier ELISA convencional, adicionando a la muestra un anticuerpo primario biotinilado dirigido contra la proteína priónica, seguido de una incubación con avidina acoplada a peroxidasa de rábano y una solución sustrato para la reacción quimioluminiscente. Esta prueba tiene una capacidad de detectar PrP^{Sc} en tejido cerebral homogeneizado en diluciones de hasta 10⁻¹⁰ y con una sensibilidad de 71.4% y especificidad del 100% en muestras de sangre de pacientes con vCJD. No obstante, el estudio no detecta PrP^{Sc} en muestras de sangre de individuos con la forma esporádica de CJD, quizás debido a la aún más baja o nula disponibilidad de la proteína priónica en sitios diferentes al sistema nervioso central en dichos pacientes como resultado de un mecanismo fisiopatológico diferente^{45,46}.

Amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA).

Para superar la limitante que imponen las bajas concentraciones de PrP^{Sc} en ciertas muestras biológicas, algunos investigadores han aprovechado la capacidad de ésta proteína para auto-propagarse, incluso en condiciones *in vitro*, mediante un mecanismo en el que emplea como sustrato a la forma normal PrP^C⁴⁷. De esta manera la presencia de una baja cantidad de PrP^{Sc} en una muestra puede ser detectada mediante la expansión *in vitro* de sus concentraciones a niveles más detectables por inmunoensayos. Para dicho propósito, en un enfoque técnico empleado recientemente llamado "amplificación cíclica de proteínas mal plegadas" (PMCA) se emplean homogeneizados de cerebro o células como fuente de sustratos de PrP^C y se les adiciona la muestra biológica en donde se quiere detectar la PrP^{Sc}, para permitir la auto-propagación de ésta última sometiendo la mezcla a ciclos de sonicación y reposo. La presencia de PrP^{Sc} en la muestra induce la conversión de PrP^C en mayores cantidades de PrP^{Sc} detectables por Western blot o inmunoensayo de fibra óptica envolvente (SOFIA)⁴⁸. En estudios en animales el uso combinado de PMCA y SOFIA permite detectar PrP^{Sc} en diluciones de hasta 10⁻¹²⁴⁹. Así mismo, en humanos, algunos estudios han permitido identificar dicha proteína en LCR de pacientes con sCJD y orina de sujetos con vCJD empleando SOFIA y Western blot como métodos de detección, respectivamente^{49,50}. No obstante, en la orina de individuos con sCJD no ha sido posible obtener resultados positivos empleando la prueba PMCA, reflejando nuevamente que los niveles de PrP^{Sc} en sitios distantes al cerebro son extremadamente bajos dada la aparición espontánea de ésta proteína en el sistema nervioso central sin diseminarse en gran medida a la periferia⁴⁹.

Conversión en tiempo real inducida por agitaciones (RT-QuIC).

Esta técnica también se basa en la capacidad de PrP^{Sc} para auto-propagarse *in vitro*. Sin embargo, a diferencia de la técnica PMCA, la prueba RT-QuIC emplea diferentes sustratos recombinantes obtenidos de bacterias a

las que se les ha insertado el gen de la proteína PrP^C, permitiendo así una mayor disponibilidad de dicho sustrato para realizar una mayor cantidad de pruebas sin necesidad de depender de la obtención de homogeneizados de cerebro o células⁵¹⁻⁵⁴. Además, la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} se realiza mediante ciclos de agitación permitiendo la interacción entre la muestra biológica y el sustrato en presencia de un marcador fluorescente llamado tioflavina T. La tioflavina T es una molécula que emite fluorescencia y es empleada como indicador de la presencia de agregados de proteínas mal plegadas, debido a que cuando ésta se une a estructuras ricas en láminas β emite mayor cantidad de fluorescencia y su espectro de emisión vira hacia el color rojo⁵⁵. La presencia de PrP^{Sc} en las muestras procesadas en dichas condiciones es finalmente detectada en un lector de fluorescencia. En un inicio y con la intención de determinar el valor diagnóstico de la prueba RT-QuIC, se realizaron algunos estudios con muestras de LCR de pacientes con CJD. Los primeros ensayos se basaron en el uso de sustratos recombinantes de proteína priónica de hámster o humano cuya longitud era mayor en términos de su cadena de aminoácidos (desde el residuo 23 hasta el 231). En estos trabajos se observaron rangos de sensibilidad y especificidad variables (87-97% y 97-100%, respectivamente) y todos ellos emplearon diferentes modificaciones de la técnica difiriendo en las condiciones de reacción con temperaturas de 37°C a 42°C en ausencia de detergentes^{51,54}. A la técnica empleada en este primer grupo de estudios se le denominó ensayo RT-QuIC de primera generación o PQ-CSF. No obstante, una mejora en el protocolo de la técnica en la que se usa como nuevo sustrato a una forma truncada de la proteína priónica de hámster (residuos 90-231) y se emplean temperaturas de incubación de 55°C en presencia del detergente duodecil sulfato de sodio (SDS) a una concentración del 0.002%, ha resultado en un incremento en la sensibilidad de la prueba y

en una reducción en los tiempos de realización de la misma comparada con los ensayos PQ-CSF (5 días vs 4-24 horas)⁵⁶. La utilidad de esta nueva generación de RT-QuIC denominada IQ-CSF ha sido evaluada en tres estudios recientes en los que se analizaron muestras de LCR y mucosa olfatoria de más de 400 pacientes con CJD y otras formas de encefalopatía espongiforme, así como en 268 controles, observándose un incremento en la sensibilidad de hasta el 97-100% y conservando un 100% de especificidad⁵⁶⁻⁵⁹. Sin embargo, la utilidad de la prueba IQ-CSF es menor para detectar la presencia de PrP^{Sc} en muestras biológicas de sujetos con formas menos frecuentes de CJD y otras variantes de encefalopatías espongiformes, ya que tiene un sensibilidad sub-óptima en casos de sCJD con patrón de movilidad tipo 2⁶⁰, mientras que los ensayos RT-QuIC PQ-CSF han mostrado ser muy útiles en casos de GSS y FFI⁶¹.

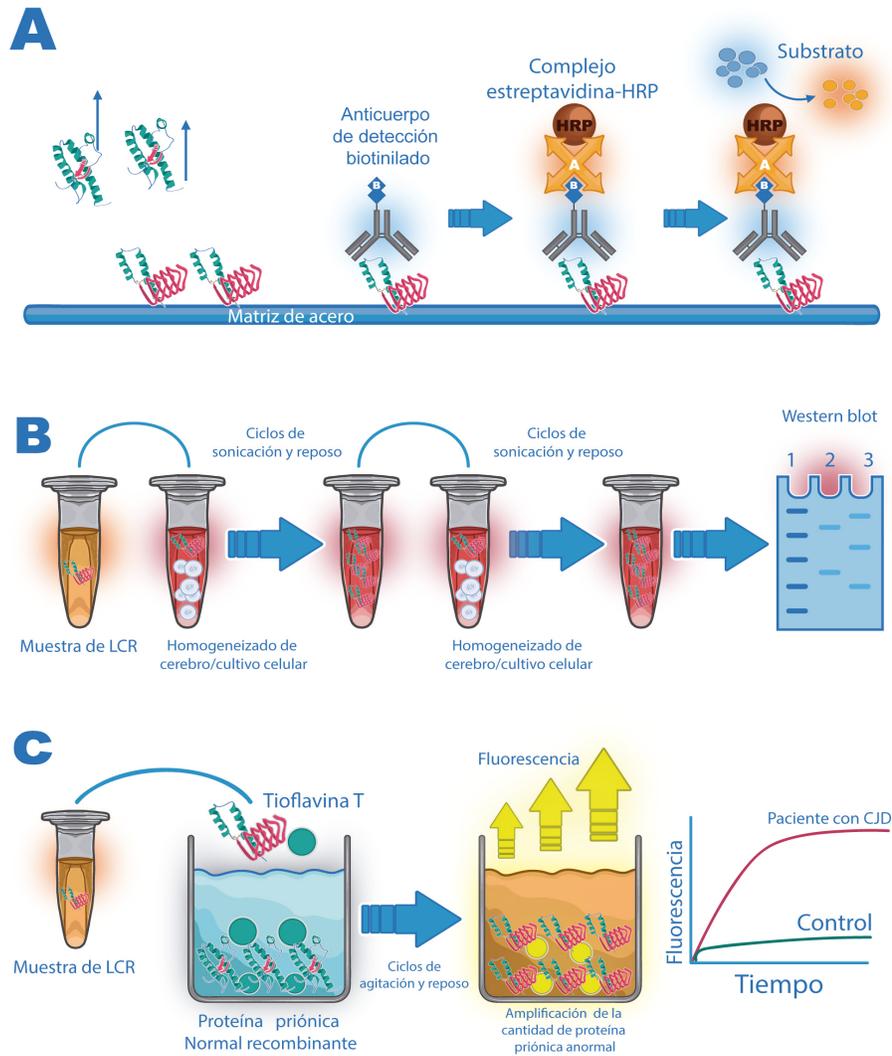
Retos y perspectivas

Los diferentes estudios realizados para determinar la utilidad diagnóstica de las pruebas aquí descritas, cuyo fundamento molecular se ilustra en la [figura 2](#), si bien constituyen una fuente invaluable de evidencia a favor de su uso en el contexto clínico de las encefalopatías espongiformes, también revelan algunas limitaciones y retos que deben ser superados con el fin de mejorar y expandir las ventajas ofrecidas por éstas nuevas herramientas. Particularmente en el caso de la detección de PrP^{Sc} en muestras de sangre de sujetos con CJD mediante el uso de ELISA ultrasensible, un problema importante resulta ser su nula utilidad diagnóstica en casos de la forma esporádica de la enfermedad^{45,46}, que como ya se mencionó, puede ser debida a la baja concentración de la proteína priónica anormal en tejidos periféricos. Así mismo, pese al enriquecimiento de PrP^{Sc} mediante el uso de una matriz de unión a base partículas de acero, dicha prueba tiene una baja sensibilidad en sujetos con la forma vCJD^{45,46}. En este contexto, es

Tabla 2. Criterios modificados por los CDC para el diagnóstico de CJD

| Forma de CJD | Subtipo diagnóstico | Criterios |
|-----------------|---------------------|--|
| CJD esporádica | Definitivo | Análisis histopatológico y/o inmunohistoquímica y/o confirmación de PrPSc proteasa resistente mediante Western blot. |
| | Probable | Demencia rápidamente progresiva y al menos dos de las siguientes características: 1.Mioclonías 2.Signos visuales o cerebelares 3.Signos piramidales/extrapiramidales 4.Mutismo acinético + un resultado positivo en alguna de las siguientes pruebas: • un EEG típico (PSWC) durante un cuadro de cualquier duración y/o, • un resultado positivo en la prueba de 14-3-3 en LCR en pacientes con duración de la enfermedad menor a 2 años • Señal anormal en núcleo caudado/putamen en DWI o en recuperación por inversión atenuada de fluidos (FLAIR) + ningún estudio de rutina que indique un diagnóstico alternativo. |
| | Posible | Demencia rápidamente progresiva y al menos dos de las siguientes características: 5.Mioclonías 6.Signos visuales o cerebelares 7.Signos piramidales/extrapiramidales 8.Mutismo acinético + resultados negativos en las pruebas de laboratorio que clasificarían al paciente como "probable" + duración de la enfermedad menor a dos años + ningún estudio de rutina que indique un diagnóstico alternativo. |
| CJD iatrogénica | | Síndrome cerebelar progresivo en un receptor de hormonas pituitarias humanas de origen cadavérico o sCJD con un factor de riesgo de exposición conocido, por ejemplo antecedente de neurocirugía con implante de duramadre. |
| CJD familiar | | CJD definitiva o probable + CJD definitiva o probable en un familiar de primer grado y/o un desorden neuropsiquiátrico + una mutación específica en el gen PRNP. |

Figura 2. Nuevas técnicas moleculares para la detección de priones en muestras biológicas de pacientes con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob



A) Fundamento de la técnica de ELISA ultrasensible para detectar PrP^{Sc} en sangre. B) Técnica de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA). C) Conversión en tiempo real inducida por agitaciones (RT-QuIC).

posible que ambos problemas puedan resolverse mediante la expansión *in vitro* de las cantidades de proteína priónica presente en la sangre empleando sustratos de PrP^C, tal y como se realiza en los ensayos de PMCA y RT-QuIC. Sin embargo, un inconveniente que dificultaría la realización de éstas dos últimas pruebas en muestras de sangre es que diferentes componentes del plasma inhiben las reacciones que llevan a la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}⁵⁴, por lo que dicho procedimiento podría resultar en una cantidad importante de falsos negativos. Si bien este problema podría ser resuelto por el enriquecimiento previo basado en la capacidad de unión de la proteína priónica anormal a algunos metales, dicha propiedad también la poseen otros elementos del plasma cuya capacidad de inhibición de las reacciones de conversión *in vitro* en pruebas de PMCA y RT-QuIC no ha sido explorada.

Al respecto, algunos investigadores han tratado de superar dicho obstáculo mediante el uso de otros métodos de purificación de la proteína PrP^{Sc} en muestras de sangre para su posterior detección por ensayos de amplificación mediante conversión de sustratos. Un estudio realizado con homogeneizados de cerebro de pacientes con vCJD diluidos en plasma así como con sangre de animales infectados con priones, ha demostrado que la inmunoprecipitación seguida de RT-QuIC PQ-CSF es una herramienta potencial para detectar cantidades mínimas de PrP^{Sc} en sangre⁶². Este trabajo se llevo a cabo antes de que se realizaran las mejoras que llevaron al surgimiento de las pruebas de RT-QuIC IQ-CSF, por lo que el potencial de obtener resultados aún más favorables empleando herramientas cada vez más eficientes justifica la realización de nuevos estudios similares en humanos. No obstante los hallazgos hechos hasta ahora abren una puerta de oportunidad para poder mejorar el diagnóstico de diferentes variantes de CJD, incluso de aquellas en las que la cantidad de proteína priónica anormal en sitios diferentes al sistema nervioso central es baja, lo cual se traduciría en métodos menos

invasivos para realizar el diagnóstico, en una mejor vigilancia de la enfermedad y en un menor riesgo de transmisión por transfusiones especialmente en el caso de vCJD.

Por otro lado, pese a que el advenimiento de las pruebas de detección de priones en muestras de LCR y mucosa olfatoria mediante la conversión *in vitro* de sustratos de PrP^C en PrP^{Sc} ha sido quizás el mayor avance en investigación traslacional en el área de las encefalopatías espongiformes, aún hay algunas limitaciones en el uso de herramientas moleculares como la PMCA y RT-QuIC. En primer lugar, parece ser que las ventajas ofrecidas por la RT-QuIC desplazarán a la PMCA sin que ésta última haya sido empleada de forma extensa en el contexto clínico. Lo anterior es debido a que para realizar una prueba de PMCA se requiere contar con tejido nervioso o una línea celular que sirva como sustrato para la conversión *in vitro* inducida por PrP^{Sc}, lo cual es metodológica y logísticamente complicado para la mayoría de los laboratorios clínicos, especialmente aquellos en países subdesarrollados. Así mismo, la expansión en la cantidad de moléculas infecciosas de PrP^{Sc} durante ensayos de PMCA representa un peligro potencial para el personal que realiza las pruebas, una situación que ha sido superada por la prueba de RT-QuIC, cuyos productos no resultan ser infecciosos al ser inoculados en animales de experimentación. Así mismo una desventaja de la PMCA es que los resultados que provee no posibilitan hacer un análisis cuantitativo que permita generar correlaciones o predicciones. Sin embargo, su uso podría seguir siendo de gran relevancia en el ámbito de la investigación básica ya que permite recrear y analizar *in vitro* las condiciones en las que ocurre la expansión de la proteína PrP^{Sc} en el cerebro. Un ejemplo de ello es un estudio reciente que ha podido reproducir y evaluar *in vitro* el tropismo que tienen las diferentes formas de PrP^{Sc} por afectar ciertas regiones del tejido cerebral y la influencia que ejercen otros factores regionales y moleculares en dicho proceso usando homogeneizados de varias regiones del cerebro y

exponiéndolos a priones provenientes de pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad⁶³. Los últimos trabajos con RT-QuIC IQ-CSF han mostrado que ésta prueba posee la mayor sensibilidad y especificidad nunca antes descrita para un estudio de diagnóstico pre-mortem de CJD, por lo que deberá ser incluida en las próximas revisiones y modificaciones de los criterios diagnósticos actuales. No obstante, quizás la única limitación de los recientes trabajos enfocados en la utilidad de ésta prueba es que la mayoría de los sujetos incluidos en los análisis se encontraban en la fase sintomática de la enfermedad, por lo que el potencial del ensayo de RT-QuIC IQ-CSF para la detección de pacientes en etapas preclínicas sigue siendo desconocido.

Finalmente, otras enfermedades neurodegenerativas cuyo sustento fisiopatológico también se encuentra en la autopropagación de formas anómalas de diferentes proteínas, podrían ser diagnosticadas empleando ensayos similares a las pruebas que inicialmente han sido desarrolladas para detectar la conversión *in vitro* de PrP^C en PrP^{Sc}⁶⁴.

De esta manera, el desarrollo de las herramientas diagnósticas aquí descritas marca una nueva era en el diagnóstico y vigilancia de las encefalopatías espongiformes y potencialmente en el de otras enfermedades neurodegenerativas, resaltando los beneficios que la investigación traslacional aporta para su aplicación en ámbito clínico de las neurociencias.

Conclusiones

Las nuevas herramientas diagnósticas para la detección de PrP^{Sc} en muestras biológicas permiten sustentar la sospecha de CJD de forma temprana con la más alta sensibilidad y especificidad nunca antes vistos, constituyendo un ejemplo de los beneficios que ofrece la investigación traslacional. El desarrollo de estas técnicas marcará una nueva era en el estudio de las encefalopatías espongiformes y mejorará la vigilancia epidemiológica de las mismas en el mediano y largo plazo. Su utilidad podría trasladarse al estudio de otros trastornos neurodegenerativos cuyo sustento fisiopatológico también se encuentra en la autopropagación de formas anómalas de diferentes proteínas importantes para la función neuronal.

Referencias

1. Prusiner SB. The prion diseases. *Brain Pathol* 1998; 8(3): 499–513.
2. Knight R, Brazier M, Collins SJ. Human prion diseases: cause, clinical and diagnostic aspects. *Contrib Microbiol*. 2004; 11: 72-97.
3. Gambetti P, Puoti G, Zou WQ. Variably protease-sensitive prionopathy: a novel disease of the prion protein. *J Mol Neurosci*. 2011; 45(3): 422-424.
4. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216(4542):136.
5. Delasnerie-Laupretre N, Alperovitch A. Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease. *Pathol Biol (Paris)*. 1995; 43(1): 22-24.
6. Budka H. Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull*. 2003; 66(1): 121-130.
7. Paterson RW, Torres-Chae CC, Kuo AL, Ando T, Nguyen EA, Wong K, et al. Differential Diagnosis of Jakob-Creutzfeldt Disease. *Arch Neurol* 2012; 69(2): 1578-1582.
8. Forner SA, Takada LT, Bettcher BM, Lobach IV, Tartaglia MC, Torres-Chae C, et al. Comparing CSF biomarkers and brain MRI in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurol Clin Pract* 2015;5(2):116-125.
9. Sharma S, Mukherjee M, Kedage V, Muttigi MS, Rao A, Rao S. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease--a review. *Int J Neurosci*. 2009;119(11):1981-1994.

10. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev.* 2008; 88(2): 673-728.
11. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet.* 1999; 49(2): 320-329.
12. Surewicz WK, Apostol MI. Prion protein and its conformational conversion: a structural perspective. *Top Curr Chem* 2011; 305: 135-67.
13. Mastrianni JA. The genetics of prion diseases. *Genet Med* 2010;12(4):187-195.
14. Hilton DA. Pathogenesis and prevalence of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol* 2006;208(2):134-41.
15. Xu K, Zhu XP. Endoplasmic reticulum stress and prion diseases. *Rev Neurosci* 2012; 23(1): 79-84.
16. Giese A, Kretzschmar HA. Prion-induced neuronal damage: the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001;253:203-217.
17. Kirschbaum WR. Zwei eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems nach Art der spatischen Pseudosklerose (Jakob). *Z Neurol Psychiatry* 1924; 92: 175-220.
18. Almer G, Hainfellner JA, Brucke T, Jellinger K, Kleinert R, Bayer G, et al. Fatal familial insomnia: a new Austrian family. *Brain* 1999; 122(1): 5-16.
19. Brownell B, Oppenheimer DR. An ataxic form of subacute presenile poliоencephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1965; 28: 350-361.
20. Mizutani T, Okumura A, Oda M, Shiraki H. Panencephalopathic type of Creutzfeldt-Jakob disease: primary involvement of the cerebral white matter. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981; 44(22): 103-115.
21. Ghorayeb I, Series C, Parchi P, Sawan B, Guez S, Laplanche JL, et al. Creutzfeldt-Jakob disease with long duration and panencephalopathic lesions: molecular analysis of one case. *Neurology* 1998; 51(1): 271-274.
22. Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992; 258(5083): 806-8.
23. Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(7): 2839-42.
24. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 1996; 39(6): 767-778.
25. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46(2): 224-233.
26. Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, et al. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(18): 10168-10172.
27. Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull.* 2003; 66: 213-239.
28. Zou WQ, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I, et al. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* 2010; 68(2):162-72.
29. Schmidt C, Haik S, Satoh K, Rábano A, Martínez-Martin P, Roeber S, et al. Rapidly progressive Alzheimer's disease: a multicenter update. *J Alzheimers Dis* 2012; 30(4): 751-756.
30. Elahi FM, Miller BL. A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. *Nat Rev Neurol.* 2017; 13(8): 457-476. doi: 10.1038/nrneurol.2017.96.
31. Vitali P, Maccagnano E, Caverzasi E, Henry RG, Haman A, Torres-Chae C, et al. Diffusion-weighted MRI hyperintensity patterns differentiate CJD from other rapid dementias. *Neurology.* 2011; 76(20): 1711-1719.
32. Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, et al. Multicentre multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open.* 2012; 2(1): e000649.
33. Collie DA, Summers DM, Sellar RJ. Diagnosing variant Creutzfeldt-Jakob disease with the pulvinar sign: MR imaging findings in 86 neuropathologically confirmed cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003; 24(8): 1560-1569.
34. Wieser HG, Schindler K, Zumsteg D. EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neurophysiol* 2006; 117(5): 935-951.
35. Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, Romero C, Taratuto A, Heinemann U, et al. Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2009; 132(10):2659-2668.

36. Centers for Disease Control and Prevention. CDC's Diagnostic Criteria for Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), Centers for Disease Control and Prevention. Georgia, USA 2010. Available at: <https://www.cdc.gov/prions/cjd/diagnostic-criteria.html> (Accessed on April 15th 2018).
37. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001; 358: 171-180.
38. Brown P, Rohwer RG, Dunstan BC, MacAuley C, Gajdusek DC, Drohan WN. The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 1998; 38(9): 810-816.
39. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363(9407):417-421.
40. 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: 527-529.
41. Wroe SJ, Pal S, Siddique D, et al. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* 2006; 368: 2061-2067.
42. Kübler E, Oesch B, Raeber AJ. Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull.* 2003; 66: 267-279.
43. Zobeley E, Flechsig E, Cozzio A, Masato E, Weissmann C. Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med* 1999; 5(4):240-243.
44. Flechsig E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, Weissmann C. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med* 2001; 7(10):679-684.
45. Edgeworth JA, Farmer M, Sicilia A, Tavares P, Beck J, Campbell T, et al. Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a blood-based assay. *Lancet* 2011; 377(9764): 487-493.
46. Jackson GS, Burk-Rafael J, Edgeworth JA, Sicilia A, Abdilahi S, Korteweg J, et al. A highly specific blood test for vCJD. *Blood.* 2014; 123: 452-453.
47. Raymond GJ, Hope J, Kocisko DA, Priola SA, Raymond LD, Bossers A, et al. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 1997; 388(6639): 285-288.
48. Barria MA, Gonzalez-Romero D, Soto C. Cyclic amplification of prion protein misfolding. *Methods Mol Biol.* 2012; 849: 199-212. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_14.
49. Rubenstein R, Chang B. Re-assessment of PrP(Sc) distribution in sporadic and variant CJD. *PLoS One* 2013; 8(7): e66352.
50. Moda F, Gambetti P, Notari S, Concha-Marambio L, Catania M, Park KW, et al. Prions in the Urine of Patients with Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *N Engl J Med.* 2014; 371(6): 530-539.
51. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med.* 2011; 17(2):175-178.
52. Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, et al. Rapid endpoint quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog.* 2010; 6(12): e1001217.
53. McGuire LI, Peden AH, Orrú CD, Wilham JM, Appleford NE, Mallinson G, et al. RT-QuIC analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 2012;72(2):278-285.
54. Cramm M, Schmitz M, Karch A, Mitrova E, Kuhn F, Schroeder B, et al. Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(3): 1896-1904.
55. Colby DW, Zhang Q, Wang S, Groth D, Legname G, Riesner D, et al. Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(52): 20914-20919.
56. Orrú CD, Groveman BR, Hughson AG, Zanusso G, Coulthart MB, Caughey B. Rapid and sensitive RT-QuIC detection of human Creutzfeldt-Jakob disease using cerebrospinal fluid. *mBio.* 2015;6(1):e02451-14.
57. Orrú CD, Bongiani M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, et al. A Test for Creutzfeldt-Jakob Disease Using Nasal Brushings. *N Engl J Med.* 2014; 371(6): 519-529.
58. Zanusso G, Bongiani M, Caughey B. A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med* 2014; 371(19): 1842-1843.
59. Groveman BR, Orrú CD, Hughson AG, Bongiani M, Fiorini M, Imperiale D, et al. Extended and direct evaluation of RT-QuIC assays for Creutzfeldt-Jakob disease diagnosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2017; 4(2): 139-144.

60. Franceschini A, Baiardi S, Hughson AG, McKenzie N, Moda F, Rossi M, et al. High diagnostic value of second generation CSF RT-QuIC across the wide spectrum of CJD prions. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 10655.
61. Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, et al. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54915.
62. Orrú CD, Wilham JM, Raymond LD, Kuhn F Schroeder B, Raeber AJ, et al. Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *mBio* .2011; 2(3): e00078-11.
63. Privat N, Levavasseur E, Yildirim S, Hannaoui S, Brandel JP, Laplanche JL, et al. Region-specific protein misfolding cyclic amplification reproduces brain tropism of prion strains. *J Biol Chem.* 2017; 292(40):16688-16696.
64. Salvadores N, Shahnawaz M, Scarpini E, Tagliavini F, Soto C. Detection of misfolded A β oligomers for sensitive biochemical diagnosis of Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 2014; 7(1): 261-268.

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias