

La tinción con el colorante rojo tiazina es un método de diagnóstico pos-mortem rápido y confiable para la enfermedad de Alzheimer

Castellanos-Aguilar Leonel^{1,2}, Martínez-Zuñiga Nayeli^{1,3}, Gutierrez-Murcia Jonathan Lénne^{1,2}, Viramontes-Pintos Amparo¹, Garcés-Ramírez Linda², de la Cruz Fidel², Guadarrama-Ortíz Parménides⁴, Luna-Muñoz José^{1*}.

¹Banco Nacional de Cerebros. LaNSE-CINVESTAV-IPN. Ciudad de México, México.

²Ciencias Químico Biológicas. Departamento de Fisiología del IPN. Ciudad de México, México

³Escuela Superior de Medicina. IPN. Ciudad de México, México.

⁴Departamento de Neurocirugía, Centro Especializado en Neurocirugía y Neurociencias México (CENNM), Ciudad de México.

*Correspondencia: José Luna-Muñoz. AV. IPN 2508 Col. San Pedro Zacatenco. Delegación Gustavo A. Madero, 07360. Ciudad de México, México. E-mail:jluna@cinvestav.mx

Resumen

Hemos usado una variedad de marcadores inmunológicos combinados con el colorante rojo tiazina (RT), un marcador específico para diferenciar el estado fibrilar del no fibrilar del amiloide- β y tau en la enfermedad de Alzheimer. En este estudio hemos usado el RT como un marcador potencial de diagnóstico en la EA en tejido cerebral sin fijar en una impronta. En los experimentos control se incluía el uso de la tinción con el colorante tioflavina-S, tejido fijado y alguna doble tinción de este material con el RT. Se seleccionaron los marcadores para la proteína tau TaC-3 y 423. El análisis hecho indican que el RT mantiene una fuerte afinidad para las marañas neurofibrilares y placas neuríticas en corteza temporal de tejido sin fijar y congelado, este se descongelo previa la realización de la impronta. Esto indica que el TR es una herramienta potencial para un rápido diagnóstico posmortem de la neuropatología de la EA. La fijación no necesariamente es requerida para la inmunorreactividad de tau en los cortes histológicos.

Palabras clave: enfermedad de alzheimer, marañas neurofibrilares, placas neuríticas. rojo tiazina, tioflavina-S

Recepción
4 /06 / 2017

Aceptado
26 /06/ 2017

Thiazine red staining is a reliable and rapid pos-mortem diagnostic tool for Alzheimer's disease

Abstract

We have used a variety of tau immunological markers combined with the dye Thiazin red (1), an accurate marker to differentiate the fibrillar from the nonfibrillar state of both amyloid- β and tau in Alzheimer's disease (AD). In this study, we used TR as a potential diagnostic marker of AD in unfixed brain tissue and tissue touch imprint. Control experiments included the use of thioflavin-S staining, fixed tissue, and some double-labeled material with TR and selected tau markers, including, Tau-C3, and 423. Our observation indicate that TR retains its strong affinity for both tangles and plaques neuritic plaques in frozen unfixed temporal cortex then thawed prior to tissue touch imprint. This indicates the potential for TR as a diagnostic tool for the rapid postmortem diagnosis of AD neuropathology. chemical fixation is not necessarily required for tau immunoreactivity on histological sections.

Key words: alzheimer's disease, neurofibrillary tangles, neuritic plaque, thiazine red, thioflavin-S.

Introducción

La enfermedad de Alzheimer es la patología neurodegenerativa más común, representando el 80% de las demencias^{2,3}. A nivel histopatológico la EA se caracteriza por la presencia de lesiones fibrilares denominadas placas neuríticas (PN) y marañas neurofibrilares (MNF) localizadas principalmente en neocorteza e hipocampo. Las PN son lesiones constituidas por un núcleo de agregados fibrilares del péptido amiloide- β ($A\beta$), al cual se asocian neuritas distróficas (ND) en forma periférica, así como procesos de células gliales. Las MNF presentes en el cerebro de los casos con la EA, pueden ser intracelulares o extracelulares, y están constituidas por formas patológicas de la proteína Tau; su aparición comienza en la corteza entorrinal y, siguen un patrón

estereotipado de agregación, hasta abarcar por completo el hipocampo, sistema límbico y a continuación la neocorteza^{4,5}.

El diagnóstico definitivo de EA es realizado pos-mortem y se basa en la presencia histopatológica de ambas lesiones. Los criterios clínicos *NINCDS-ADRDA* para el diagnóstico Alzheimer se basa en el inicio insidioso y deterioro progresivo de la memoria, así como de otras funciones cognitivas, no se observan deficiencias motoras, sensoriales o de coordinación al inicio de la enfermedad⁶. Desafortunadamente como previamente se mencionaba no hay pruebas de laboratorio que la confirmen. Debido a que el diagnóstico pos-mortem de la EA, se basa en parte en la detección precisa de

las MNF y las PN. Un número de métodos han sido desarrollados para visualizar estas lesiones fibrilares en cortes histológicos del cerebro. Estas tinciones se basan en las propiedades estructurales y bioquímicas específicas de las agregaciones fibrilares para que puedan ser diferenciados de los elementos celulares normales. Dentro de éstos métodos los más convencionales son tinciones argénticas^{5,7,8}, tioflavina-S⁹ e inmunohistoquímica, ahora el colorante rojo tiazina que parece ser más sensible que la tioflavina-S, se ha propuesto como un método de rápido diagnóstico histopatológico *post mortem*¹⁰. El desarrollo e implementación de este método de tinción con el colorante rojo tiazina en nuestro país favorecerá a un diagnóstico rápido, sencillo y de bajo costo. Por otro lado puede darnos información del estado de agregación fibrilar conformacional de las estructuras patológicas en la enfermedad de Alzheimer, el cual podría ser un método de rutina confiable y combinado con las tinciones inmunohistoquímica podría darnos más información en cuanto al procesamiento molecular de las MNF y PN. En países en donde no está permitida la extracción del encéfalo, podría ayudar en el diagnóstico tomando una pequeña biopsia cerebral.

Tinción argéntica (método *Bielschowsky*) para evidenciar las MNF y las PN en casos con la EA

Desde la primera descripción histopatológica de la EA realizada por Alois Alzheimer en 1911¹¹, hasta los estudios de Braak y Braak, a finales del siglo XX, el método Bielschowsky es clásico^{12,13}. Con ésta técnica es posible identificar las lesiones histopatológicas de la EA gracias a la afinidad de la plata por la conformación β -plegada presente en los depósitos de A β fibrilar y las MNF (figura 1 A-C. PN, flechas respectivamente). Sin embargo, el costo de los reactivos necesarios

y la difícil estandarización del procedimiento son desventajas contra técnicas actuales¹⁴. La presencia de un gran número de modificaciones sugiere que la técnica es muy inestable. La modificación de Yamamoto-Hirano en la técnica de *Bielschowsky* para el análisis histopatológico de muestras de autopsia incluidas en parafina, es la más aceptada como método estándar¹³.

En 2015, Kuninaka N¹⁵ simplificó el método de *Gallyas*, al igual que el método de *Bielschowsky*, es un técnica de impregnación de plata que es muy importante en el área de neuropatología, debido a su elevada sensibilidad para la detección de cuerpos de inclusión en el sistema nervioso central.

En Japón este método ha sido mejorado y es usado ampliamente. Aunque en la mayoría de laboratorios de patología, no se usan rutinariamente (al igual que en la tinción en *Bielschowsky*) por la necesidad de reactivos especiales, son requeridos varios procesos de tinción y técnicas especializadas. El método de *Gallyas* tiene afinidad por los gránulos argirofílicos en la enfermedad de gránulos argirofílicos, marañas neurofibrilares en la EA, y cuerpos de inclusión citoplasmáticos en atrofia multisistémica. En método simplificado de *Gallyas*, se obvió el paso del nitrato de lantano que reduce el número de reactivos requeridos y acorta el tiempo de tinción. Aún cuando el proceso se lleva aproximadamente 7 a 13 días de fijación del tejido, 1 día de inclusión en parafina, el corte histológico adherido al portaobjetos 1 día en estufa a 40°C y el tiempo requerido para la tinción es de 40 min. En la práctica, permite una visualización estable, reproducible y sensible con bajo fondo. Sin embargo, es lamentable que sus principios, detalles técnicos e interpretaciones, son diferentes según cada método y en ocasiones no es reproducible.

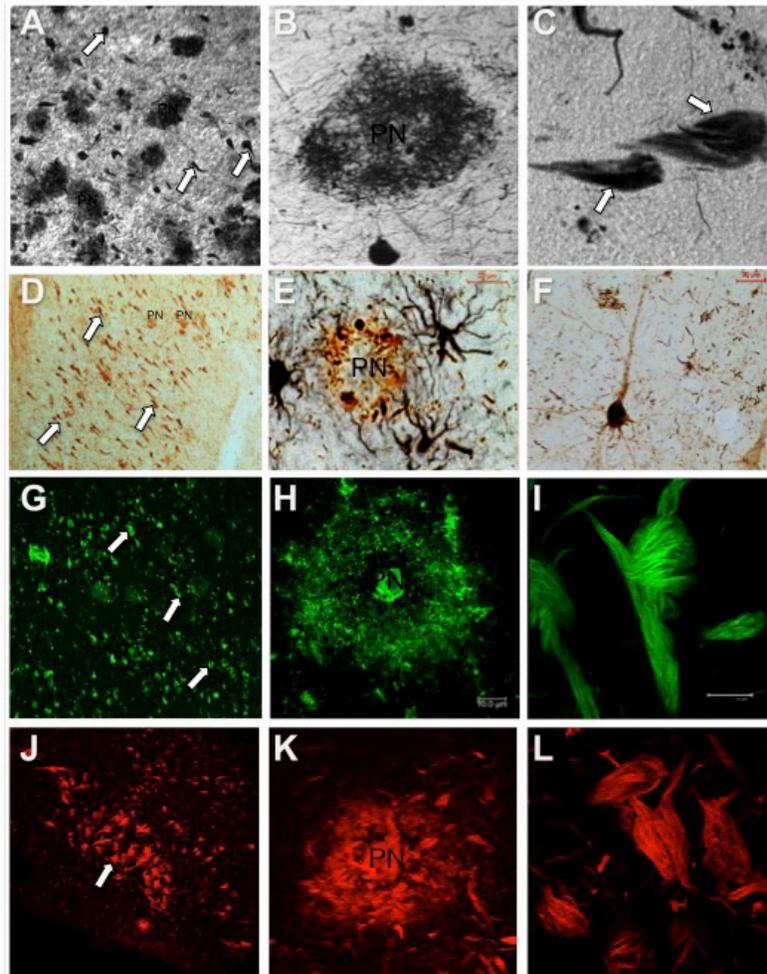


Figura 1. Técnicas comúnmente utilizadas para evidenciar las lesiones histopatológicas en el cerebro con la enfermedad de Alzheimer en tejido fijado con paraformaldehído. A-C) tinción argéntica, D-F) inmunoperoxidasa, G-I) Tioflavina-S, J-L) Rojo Tiazina. A, D, G, G) bajo aumento donde se muestra la población en general de MNF y PN; en tejido cerebral. B, E, H, K) amplificación de una PN. E) doble inmunotinción con peroxidasa color café evidencia la proteína tau en neuritas distróficas (color café) en la PN, en la vecindad de esta placa se evidenciaron las células gliales con un marcador anti GFAP, la diaminobencidina fue combinada con cloruro de cobalto para darle una coloración negra. C, F, I, L) amplificación de marañas neurofibrilares. Cortes histológico de 50 μ m de espesor. A-F) tinción campo claro. G-L) imágenes bidimensionales de una colecta de 20-30 cortes ópticos a una distancia de 1 μ m. Tomadas con microscopio confocal SP8 Leica.

El mecanismo y la interpretación entre patólogos, técnicos y neurocientíficos presenta ciertas ambigüedades. Algunos han considerado a la argirofilia como homogénea e independiente de la lesión y del método, pero los estudios comparativos han demostrado que la argirofilia es heterogénea la cual es dependiente del método y de la lesión. Cada método tiene su especificidad y dependiendo de la lesión su propia sensibilidad. Aunque actualmente no se dispone una explicación molecular cuando se combinan con inmunotinciones, lo que significa que el uso de anticuerpos y las tinciones argénticas son complementarias en la comprensión de las enfermedades neurodegenerativas^{13,16}.

Tinción con rojo congo

La tinción con Rojo Congo ha sido utilizada para la detección histológica de A β , desde principios del siglo XX. Es una tinción directa con diferentes afinidades para materiales fibrilares y no fibrilares. La tinción con rojo congo requiere experiencia y el uso de microscopio de luz polarizada. El diagnóstico de la tinción es identificando con la "birrefringencia verde manzana", puede ser difícil su visualización, por lo tanto muestra una baja sensibilidad¹⁷. Una desventaja del protocolo de esta tinción es que puede dar lugar a niveles significativos de tinción de fondo y menor reproducibilidad¹⁸. En contraste, los Fluoróforos o fluorocromos se vuelven altamente fluorescentes sólo cuando están unidos a una entidad molecular particular, por lo tanto ofrece un conjunto de técnicas altamente sensibles y convenientes para detectar componentes celulares y estructuras¹⁹.

Tioflavina-S

En cuanto a su aplicabilidad a la neuropatología rutinaria en el diagnóstico, las afinidades

generales de la tioflavina-S para la EA se consideran como ventaja porque pueden marcar PN y MNF (figura 1 G-I) con una técnica simple. Por lo general, la dificultad en la preservación a largo plazo de la tioflavina-S, limita su amplia aplicación en su uso rutinario, aunque la capacidad de almacenar digitalmente fotomicrografías puede obviar este inconveniente⁹. La unión del colorante de benzotiazol de tioflavina-S con los agregados de proteínas, se ha relacionado con la presencia de la conformación β plegada. De igual manera las tioflavinas se unen a los filamentos helicoidales apareados (PHF) en el tejido cerebral con EA²⁰. La tinción positiva con tioflavina-S se observa con una coloración de fluorescencia amarillo-verde en los depósitos de las proteínas fibrilares²¹.

La tinción con Rojo Congo y tioflavina-S son las dos técnicas histológicas más utilizadas para detectar cualquier forma de A β , ya que estos colorantes se unen a la conformación característica de la hoja plegada β del amiloide. No obstante, ambas técnicas requieren la previa fijación del tejido para preservación²².

Inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica (IHC), es una técnica de laboratorio en la cual se utilizan anticuerpos específicos para visualizar la cantidad, distribución en el tejido y localización celular de epítopes inmunogénicos en secciones histológicas de tejido fijadas en formalina. Debido a su alta especificidad, este método ha sido fundamental como herramienta diagnóstica (figura 1 D-F).

La técnica comprende dos fases:

1. Preparación de laminillas (fijación de muestras y procesamiento de tejidos) y después etapas necesarias para la reacción antígeno-anticuerpo.

El orden de realización; inicia con la recuperación de antígenos, bloqueo de sitios no específicos, bloqueo de peroxidasa endógena, incubación de anticuerpos primarios, luego se pone en contacto con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y es revelado con diaminobencidina generando un color café (figura 1 D,F), así mismo se pueden hacer tinciones múltiples (figura 1 E) y contratinción con hematoxilina, montaje y almacenamiento de laminillas. 2. Interpretación y cuantificación de la expresión obtenida.

Aunque es una técnica un tanto simple, la inmunohistoquímica tiene algunas particularidades y su resultado depende de muchos factores. La utilidad y la contribución de la inmunohistoquímica en la resolución de problemas en anatomía patológica es directamente proporcional a la experiencia de las manos que realizan la técnica y también a los ojos que interpretan los resultados. Por lo tanto, los métodos de inmunotinción requieren rigor de ejecución y cautela, debido a que pueden presentar sesgos significativos, dados por las reacciones inmunohistoquímicas y en la interpretación de resultados²³.

Impronta con el colorante rojo de tiazina

Además de las técnicas tradicionales, una tinción alternativa es la realizada con el colorante rojo de tiazina (RT), que es una estructura azo derivada de naftol, con una fluorescencia de excitación en un rango de 530-560 nm. Su característica funcional es unirse a las formas fibrilares con la conformación beta plegada. La afinidad del RT para este tipo de estructuras fue demostrado por la incubación con seda del *Bombyx mori*. La tinción con el colorante RT fluorescente²⁴, fue usada por primera vez

en el marcaje de las placas y marañas en cerebros de EA en 1995 y desde 1995^{25,26}, el colorante RT ha sido extensamente usado por nuestro laboratorio en estudios basados en microscopía confocal de cerebros con la EA (figura 1 J-L). Recién fue estudiada la doble y la triple inmunotinción del tejido cerebral con una variedad de anticuerpos dirigidos hacia epítopes de la proteína tau patológica, como lo son las hiperfosforilaciones y truncaciones, combinados con el RT. Estos estudios brindan evidencia sobre el uso del RT como una buena estrategia para la distinción entre las etapas de agregación fibrilares y no fibrilares de tau en su curso para formar las MNF de la EA^{27,28}.

Un estudio realizado por Luna Muñoz, et al. 2008¹⁰, comparó los resultados obtenidos en una impronta con RT, con los resultados de otras técnicas como son: inmunohistoquímica en tejido fijado, tinción de plata e impronta de tioflavina-S (figura 2 A,B). Se estudiaron 6 cerebros con enfermedad de Alzheimer, los cuales fueron obtenidos por donación de los familiares. Estos casos previamente fueron diagnosticados clínicamente con un Alzheimer severo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Los resultados obtenidos muestran una mayor afinidad por colorante RT, que para tioflavina-S en la impronta (figura 2 C, D). Con respecto a la inmunohistoquímica realizada en tejido fijado en paraformaldehído, se demostró la posibilidad de combinar el RT con anticuerpos dirigidos contra distintos epítopes de hiperfosforilaciones y truncaciones que se revelan durante el procesamiento patológico de la proteína tau (figura 3).

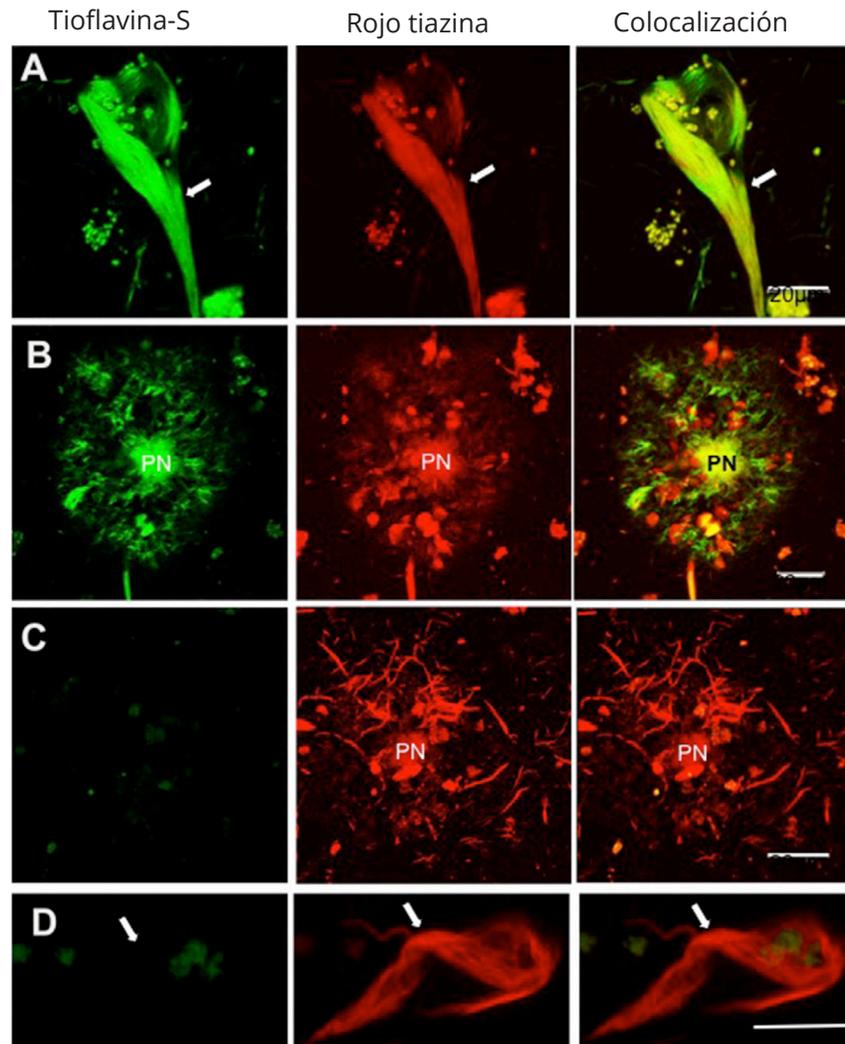


Figura 2. Doble tinción con los colorantes tioflavina-S y rojo tiazina. A, B) se observa una gran afinidad de ambos colorante por A) MNF, B) PN. Ambos colorantes muestran una amplia colocalización en la estructura en el tejido fijado. C, D) doble tinción en tejido de impronta (tejido fresco, sin fijación) en donde sólo el colorante rojo tiazina tiene afinidad por las estructuras patológicas. Mientras que el tioflavina-S no reconoció a las PN y MNF.

Lo anterior representa ventajas en el diagnóstico histopatológico rápido en cerebros de personas que padecieron EA por lo siguiente: la impronta con el colorante RT es una técnica que se realiza con rapidez, con un costo menor y mayor facilidad que las técnicas tradicionalmente ocupadas, como lo son: la tinción de plata e inmunohistoquímica en tejido fijado.

En comparación con la impronta de tioflavina-S, el RT demostró tener una mayor afinidad en su análisis con microscopía confocal. Cabe mencionar, que la microscopía confocal no es imprescindible para el análisis del RT, puesto que el microscopio de epifluorescencia es de igual modo útil para su visualización.

Por otra parte, el método por impronta puede ser realizado de manera rápida y sin necesidad de fijación previa del tejido. El marcaje con el RT de las lesiones histopatológicas en la EA resulta confiable, ya que su afinidad se limita a las formas fibrilares e insolubles de la proteína tau y del péptido A β .

La sencillez radica de esta técnica de tinción con el RT, es que este colorante es soluble en agua, el fragmento del tejido se deja en contacto con el colorante por 15 min y posteriormente se coloca en el porta objetos y se presiona manteniendo la impronta en una solución acuosa. Con respecto a la posibilidad de ser combinada con anticuerpos específicos para hiperfosforilaciones y truncaciones tau, hace del RT una herramienta en el estudio de las etapas de agregación de tau, que permite distinguir los estados fibrilares insolubles de los no fibrilares solubles (figura 3 A-C).

Por último, es importante destacar que el diagnóstico realizado por el hallazgo de huellas histopatológicas típicas de EA con impronta de RT, debe ser complementado con la presentación clínica de la enfermedad.

Y hay que ser precavidos a la hora de establecer el diagnóstico de cuadros que cursaron con una manifestación atípica, puesto que existen otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal, la demencia por cuerpos de Pick, entre otras. Que pueden ser positivas a la impronta de RT. En estos casos será necesario el estudio meticuloso de la historia clínica y el empleo de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para los cambios postraduccionales de tau, en especial truncaciones en el Aspártico 421 evidenciado por el anticuerpo monoclonal Tau-C3 (ver la figura 3 B, C) y la truncación en el glutámico 391, evidenciado por el anticuerpo 423 (ver la figura 3 A) para establecer un diagnóstico de certeza.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por CONACyT No. 142293 (R.M.)

Agradecimientos

Los autores expresan el agradecimiento a las familias mexicanas por el apoyo en la donación del tejido nervioso de sus familiares fallecidos con la enfermedad de Alzheimer. A la técnico en investigación Amparo Viramontes Pintos por su apoyo en el mantenimiento del tejido cerebral y a la Familia Mancera-Reséndiz. Dedicado a la memoria del Dr. José Raúl Mena López.

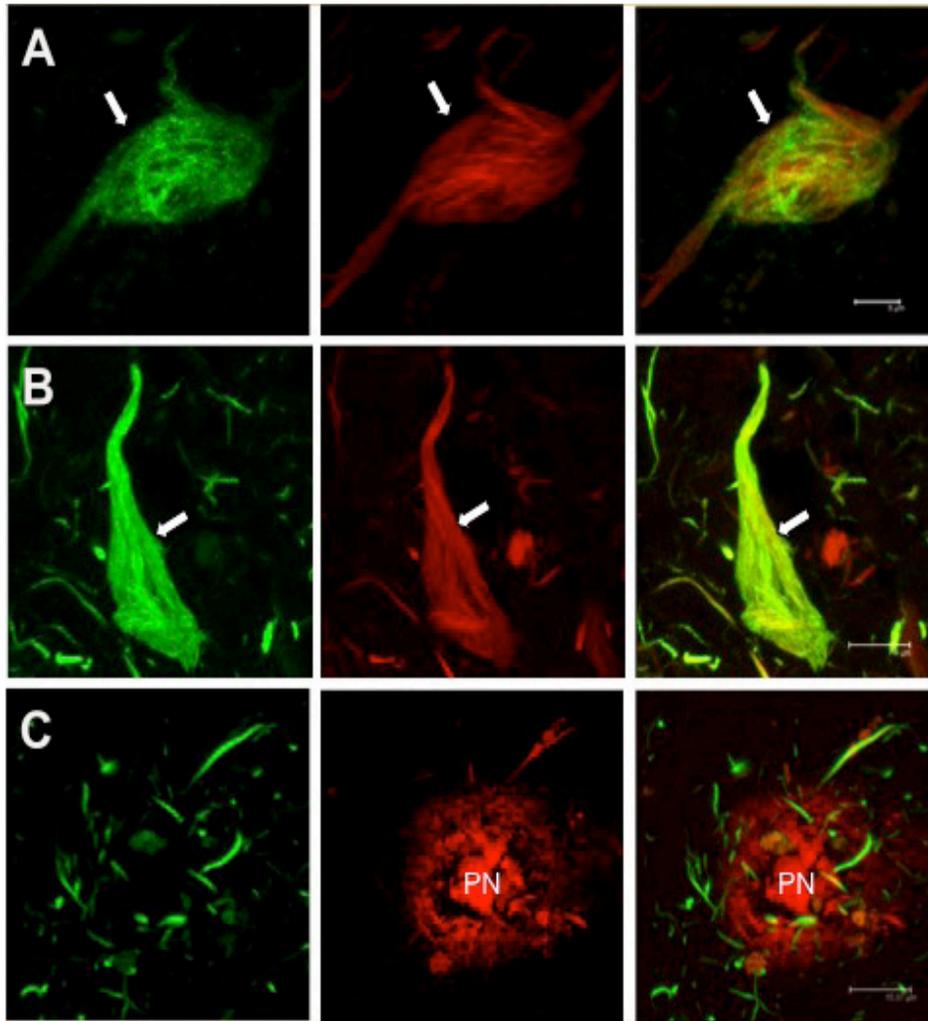


Figura 3. A) Doble tinción con un anticuerpo dirigido contra la proteína tau truncada en el Glu391 (canal verde, flecha), la cual colocaliza en diversos grados en la MNF con el colorante rojo tiazina. B) tinción con el anticuerpo que reconoce la truncación en el Aspártico 421. Reconocido por el TauC-3 canal verde. La cual colocaliza con el colorante rojo tiazina. C) Una placa neurítica. La cual evidencia la coronas de neuritas distribuidas en su vecindad donde ambos marcadores colocalizan, mientras que el depósito amiloide- β es sólo afín al colorante rojo tiazina.

Bibliografía

1. Giryh M, Gorbenko G, Maliyov I, Trusova V, Mizuguchi C, Saito H, et al. Combined thioflavin T-Congo red fluorescence assay for amyloid fibril detection. *Methods Appl Fluoresc.* 2016;4(3):034010. doi: 10.1088/2050-6120/4/3/034010. PubMed PMID: 28355156.
2. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep.* 2015;67(2):195-203. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.004. PubMed PMID: 25712639.
3. Dubois B, Padovani A, Scheltens P, Rossi A, Dell'Agnello G. Timely diagnosis for Alzheimer's disease: a literature review on benefits and challenges. *J Alzheimers Dis.* 2016;49(3):617-31. doi: 10.3233/JAD-150692. PubMed PMID: 26484931; PubMed Central PMCID: PMC4927869.
4. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82(4):239-59. PubMed PMID: 1759558.
5. Braak H, Braak E. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 1995;16(3):271-8; discussion 8-84. PubMed PMID: 7566337.
6. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of Health and Human services task Force on Alzheimer's disease. *Neurol* 1984;34(7):939-44. PubMed PMID: 6610841.
7. Aboud O, Griffin WS. Silver staining of Alzheimer's disease. *J Neurol Disord* 2014;2(6). doi: 10.4172/2329-6895.1000i103. PubMed PMID: 26949718; PubMed Central PMCID: PMC4778739.
8. Gallyas F. Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Sci Hung.* 1971;19(1):1-8. PubMed PMID: 4107507.
9. Bussiere T, Bard F, Barbour R, Grajeda H, Guido T, Khan K, et al. Morphological characterization of thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *Am J Pathol* 2004;165(3):987-95. PubMed PMID: 15331422; PubMed Central PMCID: PMC1618604.
10. Luna-Munoz J, Peralta-Ramirez J, Chavez-Macias L, Harrington CR, Wischik CM, Mena R. Thiazin red as a neuropathological tool for the rapid diagnosis of Alzheimer's disease in tissue imprints. *Acta Neuropathol* 2008;116(5):507-15. doi: 10.1007/s00401-008-0431-x. PubMed PMID: 18810470.
11. Moller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1998;248(3):111-22. PubMed PMID: 9728729.
12. Suenaga T, Hirano A, Llana JF, Ksiezak-Reding H, Yen SH, Dickson DW. Modified Bielschowsky and immunocytochemical studies on cerebellar plaques in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1990;49(1):31-40. PubMed PMID: 1688924.
13. Uchihara T. Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathol* 2007;113(5):483-99. PubMed PMID: 17401570.
14. Vallet PG, Guntern R, Hof PR, Golaz J, Delacourte A, Robakis NK, et al. A comparative study of histological and immunohistochemical methods for neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1992;83(2):170-8. PubMed PMID: 1373017.
15. Kuninaka N, Kawaguchi M, Ogawa M, Sato A, Arima K, Murayama S, et al. Simplification of the modified Gallyas method. *Neuropathol* 2015;35(1):10-5. doi: 10.1111/neup.12144. PubMed PMID: 25178396; PubMed Central PMCID: PMC4491351.

16. Tsamis K, Mytilinaios D, Njau SN, Psaroulis D, Mavroudis J, Costa V, et al. The combination of silver techniques for studying the pathology of Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 2008;118(2):257-66. doi: 10.1080/00207450701591115. PubMed PMID: 18205081.
17. Howie AJ, Owen-Casey MP. 'Apple-green birefringence' of amyloid stained by Congo red. *Kidney Int*. 2012;82(1):114; author reply doi: 10.1038/ki.2012.89. PubMed PMID: 22699383.
18. Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL. Is Congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem* 2001;276(25):22715-21. doi: 10.1074/jbc.M011499200. PubMed PMID: 11410601.
19. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804(7):1405-12. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001. PubMed PMID: 20399286; PubMed Central PMCID: PMC2880406.
20. Santa-Maria I, Perez M, Hernandez F, Avila J, Moreno FJ. Characteristics of the binding of thioflavin S to tau paired helical filaments. *J Alzheimers Dis* 2006;9(3):279-85. PubMed PMID: 16914838.
21. Sun A, Nguyen XV, Bing G. Comparative analysis of an improved thioflavin-s stain, Gallyas silver stain, and immunohistochemistry for neurofibrillary tangle demonstration on the same sections. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(4):463-72. PubMed PMID: 11897799.
22. Rajamohamedsait HB, Sigurdsson EM. Histological staining of amyloid and pre-amyloid peptides and proteins in mouse tissue. *Methods Mol Biol* 2012;849:411-24. doi: 10.1007/978-1-61779-551-0_28. PubMed PMID: 22528106; PubMed Central PMCID: PMC3859432.
23. Matos LL, Truffelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* 2010;5:9-20. PubMed PMID: 20212918; PubMed Central PMCID: PMC2832341.
24. Resch JF, Lehr GS, Wischik CM. Design and Synthesis of a Potential Affinity Cleaving Reagent for Beta-Pleated Sheet Protein Structures. *Bioorg Med Chem Lett* 1991;1(10):519-22. doi: Doi 10.1016/S0960-894x(01)80457-1. PubMed PMID: WOS:A1991GN27800007.
25. Mena R, Edwards P, Perez-Olvera O, Wischik CM. Monitoring pathological assembly of tau and beta-amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1995;89(1):50-6. PubMed PMID: 7709731.
26. Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1996;91(6):633-41. PubMed PMID: 8781663.
27. Luna-Munoz J, Chavez-Macias L, Garcia-Sierra F, Mena R. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007;12(4):365-75. PubMed PMID: 18198423.
28. Luna-Munoz J, Garcia-Sierra F, Falcon V, Menendez I, Chavez-Macias L, Mena R. Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Ab-50 antibody in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2005;8(1):29-41. PubMed PMID: 16155347.

Artículo sin conflicto de interés

© Archivos de Neurociencias