



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE
POLIMORFISMOS EN EL GEN *PRNP* EN CONTROLES
MESTIZOS MEXICANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA
FRANCISCO MUÑOZ CALAHORRA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor:	MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
VOCAL:	Profesor:	SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
SECRETARIO:	Profesor:	PETRA YESCAS GÓMEZ
1er. SUPLENTE:	Profesor:	NANCY MONROY JARAMILLO
2° SUPLENTE:	Profesor:	TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”

DRA. PETRA YESCAS GÓMEZ
ASESOR DEL TEMA

Q.F.B. LIZBETH ESMERALDA GARCÍA VELÁZQUEZ
SUPERVISORA TÉCNICA

FRANCISCO MUÑOZ CALAHORRA
SUSTENTANTE

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que me ha dado para acceder a educación pública de un altísimo nivel.

A la Facultad de Química, por convertirse en mucho más que un segundo hogar.

A la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, per tots els reptes i aprenentatges dins i fora de les aules.

A la Dra. Perla Castañeda López y la Q.F.B. María Guadalupe Castorena Adame, por su enorme disposición para apoyar en todo y en cualquier momento.

A la Q.F.B. Norma Angélica Castellanos Chávez y el Departamento de Exámenes Profesionales, que hicieron posible esta misión imposible.

Al Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, por ser el escenario ideal de esta historia.

A la Dra. María Elisa Alonso Vilatela, por su pasión inquebrantable hacia el trabajo del Departamento.

A mi tutora, la Dra. Petra Yescas Gómez, por entender y aceptar desde el principio mi loca idea de concluir el trabajo en este año y por la confianza que tuvo en mí en cada paso del camino.

A la Q.F.B. Lizbeth García Velázquez, que tuvo la paciencia de enseñarme parte de lo mucho que sabe y que siempre estuvo ahí para cualquier duda o corrección.

A mis compañeros del laboratorio, investigadores y estudiantes, por estar dispuestos a darme consejos y palabras de apoyo en todo momento, aunque también tuvieran mil cosas en la cabeza. También a mis alumnas, que participaron activamente para obtener algunos de mis resultados.

A los miembros titulares del jurado que evaluó este trabajo, la Dra. Marisol López López y el Dr. Samuel Canizales Quinteros, por ser cómplices de las etapas finales de este proceso y por sus valiosas correcciones. De igual modo, a la M. en C. Nancy Monroy Jaramillo y la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, porque sé que hubieran hecho lo mismo si hubiera sido necesario.

Dedicatoria

A mi madre, por ser la persona más fuerte y porque después de veintitantos años sigues siendo mi primera referencia para cualquier cosa y siempre tienes una solución y una buena cara, sin importar el tamaño del problema.

A mi padre, porque pones el corazón en todo lo que haces y porque a veces creo que, indebidamente, nos quieres más que a ti mismo. Porque desde hace muchos años me sorprendes con las cosas que sabes y porque espero algún día lograr que sea al revés.

A ambos, porque no descansan hasta que lo tenemos todo y más, y por insistir siempre en que tenemos la capacidad de buscar y conseguir lo que deseamos.

A mi hermanita, porque eres la mejor amiga del mundo y la enemiga que más quiero. Porque algunas veces me has convertido en héroe, sin que me lo merezca y sin imaginarte lo mucho que te admiro. Siempre voy a estar cuando me necesites.

A la Yaya, perquè estic segur que les teves ganes de veure'ns créixer faran que et pugui abraçar molts cops més. Perquè encara que tens un munt d'històries per explicar sempre trobes un moment per escoltar les meves.

A Isa, porque hemos sido fuertes y, aunque ha sido duro, hemos llegado hasta aquí. Porque la idea de estar juntos ha sido el motor que ha impulsado este esfuerzo. Por tu cariño y tantos buenos momentos que me hacen estar convencido de que eres lo mejor que me ha pasado. A mi familia catalana-canaria por adoptarme, quererme y cuidarme desde el primer día.

A mis amigos y amigas de todos lados, porque no pidieron entrar en mi vida pero han aceptado permanecer en ella. Porque cada palabra, abrazo, gesto, historia o canción ha dejado en mí una huella imborrable. Yo sé que no hace falta que los escriba para que cada uno vea su nombre entre estas líneas.

Al Colegio Madrid, que fue el inicio y la base de todo y que siempre será el dueño de *los recuerdos de nuestra niñez*.

A todos los que, como yo, creen que esta locura es posible.

Índice

1.	Abreviaturas	1
2.	Resumen	5
3.	Marco teórico.....	7
3.1....	Historia	7
3.2....	Gen <i>PRNP</i>	9
3.3....	Proteína prión (PrP)	11
3.3.1	Estructura	11
3.3.2	Localización	13
3.3.3	Funciones	13
3.4....	Genes relacionados con <i>PRNP</i>	17
3.5....	Conversión PrP ^c -PrP ^{sc} y desarrollo de las enfermedades priónicas	21
3.6....	Enfermedades priónicas humanas.....	23
3.6.1	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.....	23
3.6.2	Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	28
3.6.3	Insomnio fatal.....	29
3.6.4	<i>Kuru</i>	31
3.6.5	Consideraciones diagnósticas.....	33
3.6.6	Terapia.....	37
3.7....	Enfermedades causadas por priones en animales.....	38
3.8....	Mutaciones en el gen <i>PRNP</i>	39
3.9....	Polimorfismos en el gen <i>PRNP</i>	41
4.	Planteamiento del problema	44
4.1....	Hipótesis.....	44
4.2....	Objetivos.....	44
5.	Diseño experimental	45

5.1....Población de estudio.....	45
5.2....Toma de muestra.....	46
5.3....Extracción de DNA por el método de sales-cloroformo	46
5.4....Cuantificación de DNA.....	47
5.5....Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	47
5.6....Resolución de productos de PCR	48
5.7....Amplificación de productos con variantes de número de copia	49
5.8....Resolución y purificación de dobles bandas.....	49
5.9....Reacción de secuenciación.	50
5.10..Purificación de los productos de la reacción de secuenciación	51
5.11..Secuenciación automatizada	51
5.12..Análisis de secuencias para detección de polimorfismos	52
5.13..Reacción de restricción enzimática	52
5.14..Resolución de los productos de restricción enzimática	53
6. Resultados y discusión	55
7. Conclusiones	64
8. Perspectivas	64
9. Bibliografía.....	65
10. Apéndices.....	81
10.1..Reactivos.....	81
10.2..Equipo y materiales	82

Índice de Tablas

1: Evolución de los criterios diagnósticos para sCJD.....	34
2: Criterios diagnósticos para vCJD.....	36
3: Enfermedades priónicas en animales.....	38
4: Reactivos utilizados para la PCR.....	48
5: Condiciones de la PCR.....	48
6: Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación.....	50
7: Condiciones de la reacción de secuenciación.....	50
8: Reactivos utilizados en la restricción con <i>PvuII</i>	52
9: Reactivos utilizados en la restricción con <i>XceI</i>	52
10: Reactivos utilizados para la preparación del gel de poliacrilamida al 6%.....	53
11: Frecuencia del polimorfismo 1-OPRD en diversas poblaciones.....	57
12. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs encontrados en el gen <i>PRNP</i>	60
13: Frecuencia del polimorfismo A117A en diversas poblaciones.....	61
14: Frecuencia del polimorfismo M129V en diversas poblaciones.....	62

Índice de Figuras

1: Estructura de PrP ^C	11
2: Esquema lineal de la estructura de la proteína PrP ^C	12
3: Forma madura de PrP ^C	13
4: Actividad anti-apoptótica de PrP	15
5: Esquema del <i>locus PRNP</i>	18
6: Esquema lineal de la estructura de la proteína Dpl	18
7: Esquema lineal de la estructura de la proteína Shadoo	19
8: Modelo de interacción entre PrP ^C y Shadoo	20
9: Modelo de replegamiento	21
10: Modelo de la semilla	22
11: Neuropatología observada en CJD	24
12: Neuropatología observada en vCJD	27
13: Comparación de las edades de inicio de los casos de vCJD y sCJD	28
14: Neuropatología observada en GSS	29
15: Neuropatología observada en Insomnio Fatal	30
16: Evolución del genotipo en el codón 129 de <i>PRNP</i> en población expuesta al <i>kuru</i>	33
17: Mutaciones en el gen <i>PRNP</i> asociadas a TSEs	39
18: Polimorfismos en el gen <i>PRNP</i>	41
19: Metodología general	45
20: Resolución de los productos de PCR	55
21: Resolución de bandas dobles	56
22: Electroferogramas mostrando los distintos genotipos encontrados en el codón 117 de <i>PRNP</i>	57
23: Electroferogramas mostrando los distintos genotipos encontrados en el codón 129 de <i>PRNP</i>	58
24: Resolución de productos de restricción con <i>PvuII</i>	59
25: Resolución de productos de restricción con <i>XceI</i>	60

1. Abreviaturas

ATRA	Ácido transretinoico
BLGR	Amortiguador de lisis de glóbulos rojos
BSE	Encefalopatía espongiforme bovina
CJD	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
C-terminal	Extremo carboxilo terminal de la proteína
^{C_{tm}} PrP	Proteína prión transmembranal con el extremo carboxilo terminal en el interior de la célula
CWD	Enfermedad del desgaste crónico
^{C_y} tPrP	Proteína prión citosólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dpl	Proteína Doppel (doblete de la proteína prión)
DWI	Imagen de resonancia magnética nuclear por difusión
EEG	Electroencefalograma
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Cinasas de regulación extracelular
EUE	Encefalopatía espongiforme de los ungulados exóticos
fCJD	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar
FFI	Insomnio familiar fatal
FI	Insomnio fatal

FLAIR	Imagen de resonancia magnética nuclear por recuperación de inversión de atenuación de fluido
FSE	Encefalopatía espongiiforme felina
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
GSS	Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
IC	Intervalo de confianza
iCJD	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica
kDa	KiloDalton
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LINE	Elementos nucleares dispersos largos
MER	Elementos medianamente repetidos
MRI	Imagen de resonancia magnética
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
N-CAM	Molécula de adhesión de células neurales
NHP	Encefalopatía espongiiforme transmisible en primates no-humanos
N-terminal	Extremo amino terminal de la proteína
^{Ntm} PrP	Proteína prión transmembranal con el extremo amino terminal en el interior de la célula
OPR	Repetidos de octapéptidos
OPRD	Delección de repeticiones de octapéptidos
OPRI	Inserción de repeticiones de octapéptidos

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PRND</i>	Gen de la proteína prión doblete (Doppel)
<i>PRNP</i>	Gen de la proteína prión humana
<i>PRNT</i>	Gen de la proteína prión específico de testículos
PrP	Proteína prión
PrP ^C	Proteína prión celular
PrP-GF	Familia de genes de la proteína prión
PrP ^{Sc}	Proteína prión scrapie
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RFLP	Polimorfismos de longitud variable de fragmentos de restricción
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
^{Sec} PrP	Proteína prión totalmente translocada
sFI	Insomnio fatal esporádico
Sho	Proteína Shadoo (sombra de la proteína prión)
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SOD	Superóxido dismutasa

<i>SPRN</i>	Gen sombra de la proteína prión
TBE	Amortiguador Tris-Boratos-EDTA
TEMED	Tetrametilendiamina
TME	Encefalopatía transmisible del mink
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSE	Encefalopatías espongiformes transmisibles
UV	Ultravioleta
vCJD	Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

2. Resumen

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs), o enfermedades priónicas, son un grupo de padecimientos neurodegenerativos poco comunes, crónicos, irreversibles y fatales que afectan a humanos y animales. Los padecimientos descritos en el humano son la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el insomnio fatal (FI) y el *kuru*. Las TSEs tienen una muy baja incidencia en el mundo, reportándose anualmente por cada millón de habitantes entre 1 y 2 casos de la forma esporádica de CJD, que es la más frecuente de estas enfermedades.

A pesar de su baja incidencia, estas enfermedades han resultado de gran interés para muchos investigadores debido a su etiología única en la biología, ya que pueden existir casos esporádicos, hereditarios y adquiridos. También han roto paradigmas de la biología ya que el agente causante y transmisible de estas enfermedades es de naturaleza exclusivamente proteica, sin ácidos nucleicos.

La proteína en cuestión es una variante conformacional de la proteína prión, una proteína endógena presente en las membranas celulares de diversos tejidos, especialmente en el sistema nervioso central.

La proteína prión está codificada por el gen *PRNP*, presente en una gran variedad de especies animales. En dicho gen se han reportado una treintena de mutaciones, responsables de las variantes hereditarias de las enfermedades priónicas. Adicionalmente a las mutaciones, se encuentran en el gen *PRNP* diversos polimorfismos, algunos de los cuales tienen la capacidad de modificar la susceptibilidad o resistencia a las variantes esporádicas, familiares y adquiridas de TSEs, además de modificar el fenotipo de éstas.

La frecuencia de estos polimorfismos, especialmente el situado en el codón 129 (M129V), ha sido estudiada en diversas poblaciones alrededor del mundo. La importancia de este polimorfismo se debe a que existe evidencia de que el genotipo heterocigoto es protector frente a las enfermedades priónicas esporádicas y adquiridas. Las formas familiares de estas enfermedades también son modificadas por este polimorfismo, por ejemplo en el caso de la mutación D178N que causa insomnio familiar fatal al estar asociado al alelo 129M y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob al presentarse el alelo 129V. A la fecha no existen reportes de los polimorfismos presentes en el gen *PRNP* en población mestiza mexicana.

En este trabajo se emplearon las técnicas de secuenciación y análisis RFLP para la determinación de las frecuencias de los polimorfismos del gen *PRNP* presentes en 340 muestras de controles sanos mestizos mexicanos. Se encontraron 3 polimorfismos previamente reportados en otras poblaciones: la delección de 24 pares de bases en la región de octapéptidos repetidos (1-OPRD), el polimorfismo sinónimo A117A y el polimorfismo M129V. Las frecuencias encontradas en este último difieren de lo reportado en poblaciones nativas de Latinoamérica y no cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg, sugiriendo la existencia de factores de desequilibrio como la introducción relativamente reciente de un genotipo diferente al originalmente encontrado en la región.

3. Marco teórico

3.1 Historia

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs), o enfermedades priónicas, son un grupo de padecimientos neurodegenerativos poco comunes, crónicos, irreversibles y fatales que afectan a humanos y animales [1, 2, 3]. Este tipo de enfermedades se conoce desde el siglo XVIII, cuando aparecieron reportes de una enfermedad que afectaba a ovejas y cabras en el Reino Unido [4]. En un texto de 1750 se describe que las ovejas mordían sus patas y se rascaban el lomo, además de presentar irritabilidad, temblor, convulsiones y pérdida de peso hasta, inevitablemente, morir [5]. La enfermedad recibió diversos nombres hasta el definitivo *scrapie*, que se refiere a que los animales se rascaban hasta desprender pedazos de piel [5, 6]. Los exámenes histopatológicos de cerebros de las ovejas con *scrapie* mostraron espongiosis, gliosis y pérdida neuronal [4]. En 1881 [7] se describió en Francia un caso similar al *scrapie* en un buey, indicando que estas enfermedades también afectaban bovinos [4].

A principios del siglo XX, Hans Gerhard Creutzfeldt [8] y Alfons Maria Jakob [9] reportaron, por separado, casos de pacientes que habían sufrido deterioro mental severo. En todos los casos reportaron las mismas características neuropatológicas encontradas en los cerebros de animales con *scrapie* [4]. Por otro lado, los neurólogos Josef Gerstmann, Ernst Sträussler e Ilya Mark Scheinker [10] reportaron la muerte de varios miembros de una familia que habían sido afectados por ataxia cerebelosa y demencia progresiva [11].

A partir de 1957 ocurrieron una serie de eventos que ampliarían el conocimiento sobre las enfermedades priónicas. Fue en este año cuando Daniel Carleton Gajdusek se incorporó al grupo de Vincent Zigas que estudiaba una extraña enfermedad, similar a una encefalitis, que tenía una alta incidencia en los habitantes de un área muy restringida en las tierras altas de Papúa Nueva Guinea [12]. La enfermedad fue llamada *kuru*, que en el idioma local significa “temblor” o “miedo”. Las personas afectadas por el *kuru* presentaban ataxia (pérdida de coordinación), temblores y demencia, que los llevaba a la muerte en menos de un año [1, 4]. Los investigadores observaron el rito de canibalismo practicado en la región pero notaron que otros grupos que lo practicaban no presentaban la enfermedad, por lo que el canibalismo *per se* no era el causante de la enfermedad, sino un vehículo para su propagación [6].

William Hadlow fue el primero en proponer una relación entre el *scrapie* y el *kuru* al ver las micrografías de la patología provocada por la segunda. Sabiendo que el *scrapie* se había podido transmitir entre ovejas [13], el grupo de Gajdusek trabajó en probar que el *kuru* podía transmitirse a chimpancés. Sus resultados fueron publicados en 1966 [14]. Un par de años más tarde, el mismo grupo demostró la transmisibilidad de la enfermedad descrita por Creutzfeldt y Jakob [15].

Hasta ese momento se había demostrado que estas enfermedades eran transmisibles no sólo entre individuos de la misma especie, sino también entre especies. Sin embargo, aún se ignoraba la naturaleza del agente causal. Se propuso inicialmente que se trataba de un lentivirus, basándose en los largos tiempos de incubación [15, 16].

Tikvah Alper *et al.* observaron los efectos de la radiación ultravioleta en las suspensiones de homogenizados de cerebro de ratones infectados y concluyeron que la capacidad del agente causal del *scrapie* para replicarse no dependía de un ácido nucléico [17].

En 1967, Gibbons y Hunter discutieron los “pros y contras” de las teorías que proponían que el agente del *scrapie* fuera un virus, una proteína, un carbohidrato o una membrana [18]. Según ellos, la teoría del virus parecía poco probable debido a la incapacidad para aislarlo o visualizarlo, sin embargo no la descartaron del todo. Los resultados de pruebas de inactivación apoyaban la idea de que el *scrapie* fuera causado por una proteína, pero los autores no se explicaban la excepcional resistencia al calor o al tratamiento con formalina, además de los efectos limitados del tratamiento con enzimas proteolíticas. Por su parte, la sensibilidad al tratamiento con fenol y urea (reactivos utilizados en la extracción de polisacáridos) hizo que se descartara que el agente fuera un carbohidrato. Finalmente, basándose en la conservación de la capacidad para transmitir la enfermedad después de diversas extracciones, los autores sugirieron que el agente podría ser una membrana celular [5].

Ese mismo año, el matemático John Stanley Griffith [19] también propuso que el agente podría ser una proteína y además explicó tres ideas de su replicación, todas basadas en que la proteína era codificada por el huésped. Una de estas ideas permanece vigente y se basa en que la introducción de una “semilla” de una forma modificada de la proteína podría causar que las proteínas nativas se unieran a ella y que, eventualmente, esta semilla se dividiría, dando pie a una propagación exponencial [5].

Finalmente, el primero en utilizar el término “prión” fue Stanley Ben Prusiner en 1982 [20]. El término original era “*proin*” y se refiere a la naturaleza proteica del agente (*proteinaceous infectious particle*), sin embargo Prusiner lo sustituyó por “*prion*” [6]. A partir de entonces, los esfuerzos de Prusiner se enfocaron en aislar y purificar esta proteína, hecho que lograron en 1984, llamándola PrP 27-30 (*Prion Protein*, con un peso de 27-30 kDa) [21].

Un año más tarde, esta proteína fue encontrada en cerebros de ratones y hámsteres sanos, por lo cual se utilizó el término PrP^C para referirse a la Proteína Prión Celular y PrP^{Sc} para la variante causante de Scrapie. También se identificó el gen responsable, que fue llamado gen de la proteína prión, *Prnp* [22]. Un año más tarde, el mismo gen fue identificado en humanos y para éste se adoptó la nomenclatura en mayúsculas (*PRNP*). [23, 24].

3.2 Gen *PRNP*

El gen *PRNP*, que codifica para la proteína prión humana, se encuentra en el *locus* 20p13 y comprende 15.4 kpb. El gen está compuesto por dos exones: el primero, no traducido, de 277 pb y el segundo, de 2380 pb, que contiene la totalidad del marco abierto de lectura (ORF) de 762 pb. Los dos exones están separados por un intrón de aproximadamente 13 kpb [25, 26]. Se han propuesto 5 variantes de *splicing* para este gen [27]; sin embargo, el hecho de que toda la región codificante se encuentre en el mismo exón, relativamente alejada (6-11 pb) del sitio de *splicing*, asegura que no se encuentren diferentes isoformas de la proteína por variantes de *splicing* alternativo [1, 28].

La región promotora del gen *PRNP* contiene una isla CpG de unos 400 pb y carece de una caja TATA o un motivo iniciador, características encontradas en los genes constitutivos. Se encuentran en ella sitios de unión a factores de transcripción putativos, como Sp1, Ap-1, Ap-2 y una caja CCAAT, agrupados en dos clusters [29].

La expresión de este gen puede verse afectada por diversos factores exógenos. Se ha encontrado la presencia de elementos de choque térmico en el promotor, por lo que este tipo de estrés aumenta la expresión de *PRNP* a nivel de mRNA y de proteína entre 1.5 y 2.5 veces [30]. También se ha encontrado que la expresión de proteínas de choque térmico aumenta en las etapas finales de las TSEs, lo cual podría explicar la rápida progresión de estas enfermedades hacia las últimas etapas [31].

El estrés oxidativo, probado con un modelo de oxígeno hiperbárico, también aumentó la expresión de *PRNP*. Este factor también provocó un aumento en la expresión de proteínas de choque térmico, pudiendo ser éste el mecanismo por el que se aumentó la expresión de *PRNP* [31, 32]. El mismo mecanismo se observó en el aumento de expresión de *PRNP* causado por hipoglucemia [33].

El tratamiento con óxido nítrico (NO), tanto directa como indirectamente, como respuesta al tratamiento con lipopolisacáridos, también aumentó la expresión de *PRNP* mediante un mecanismo involucrado en la supervivencia celular, implicando que la regulación positiva de PrP^C ocurre como una respuesta de supervivencia [31, 34]. También se ha reportado regulación positiva de la expresión de *PRNP* en casos de accidente cerebrovascular [35].

Se observó disminución en la expresión de *PRNP* después del tratamiento con ácido transretinóico (ATRA), un fármaco utilizado en el tratamiento de la leucemia promielocítica. El tratamiento de esta enfermedad se basa en que el ATRA induce la diferenciación terminal de la clona maligna [31]; sin embargo, se plantea que la regulación negativa de la expresión de *PRNP* es independiente de la maduración, en un mecanismo dependiente de síntesis *de novo* de proteínas [36].

El gen *PRNP* se encuentra altamente conservado en mamíferos. Se reporta típicamente >50% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con respecto al humano, aunque la identidad asciende hasta un 95% en la región de repetidos de octapéptidos y otras regiones estructuradas asociadas a enfermedades [37]. Este hecho parece explicar que las enfermedades priónicas sean transmisibles entre especies [38]. La estructura de la proteína prión (PrP) será discutida más adelante.

3.3 Proteína prión (PrP)

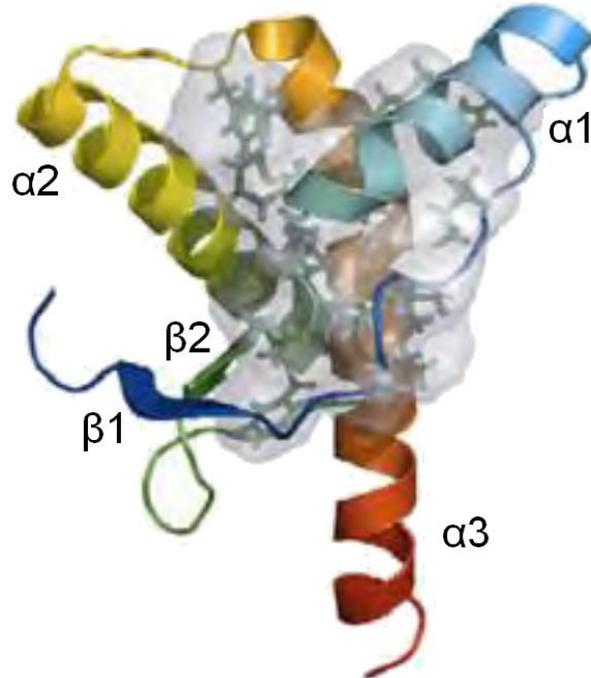


Figura 1: Estructura de PrP^C. Obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN) a pH 7.0. Se observan las tres hélices α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y las dos láminas β ($\beta 1$ y $\beta 2$) además del núcleo hidrofóbico, marcado en gris. Modificada de [39].

3.3.1 Estructura

La proteína prión humana (PrP^C) está formada por 253 aminoácidos y tiene un peso molecular de 32-35 kDa. Su síntesis involucra una translocación al lumen del retículo endoplásmico donde son escindidos los péptidos señal de cada extremo (residuos 1-22 y 231-253) al mismo tiempo que se añade un grupo glucosilfosfatidilinositol al residuo 230 (serina). Esta modificación le permite a la proteína anclarse, previo paso por el aparato de Golgi, a la cara externa de la membrana plasmática, concretamente en dominios de “balsas lipídicas”, ricos en colesterol [40].

PrP^C puede adoptar cuatro topologías diferentes: la forma totalmente translocada (^{Sec}PrP), que compone más del 90% del total de PrP producido, dos formas transmembranales opuestas (^{Ntm}PrP, por tener el extremo amino-terminal en el interior de la célula y ^{Ctm}PrP, por tener el extremo carboxilo-terminal en el interior de la célula) y una forma citosólica soluble (^{Cyt}PrP) [41]. Otros autores, sin embargo, comprobaron que la

forma citosólica es en realidad un artefacto de la sobre-expresión y la presencia de inhibidores de proteosoma [42, 43].

PrP^C tiene regiones bien definidas (Fig. 2): Los residuos 51 a 91 forman la región de repetidos en la que se encuentra 1 nonapéptido seguido de 4 octapéptidos cuya secuencia de aminoácidos es idéntica, aunque hay diferencias en la secuencia de nucleótidos. Esta diferencia se refleja en la notación R1-R2-R2-R3-R4, en la que R1 corresponde al nonapéptido, seguido por dos octapéptidos idénticos en su secuencia de nucleótidos y finalmente dos octapéptidos más, codificados por secuencias de nucleótidos diferentes. Por su parte, los residuos 106 a 126 forman el dominio hidrofóbico, altamente conservado. Más adelante se encuentra el dominio globular, en el que encontramos tres estructuras de α -hélice ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y dos láminas β ($\beta 1$ y $\beta 2$) [40].

Adicionalmente, se encuentran en la proteína un puente disulfuro, formado entre las cisteínas de las posiciones 179 y 214, y dos sitios de n-glucosilación en las treoninas de las posiciones 181 y 197. Las versiones no glucosiladas, así como las mono- y di-

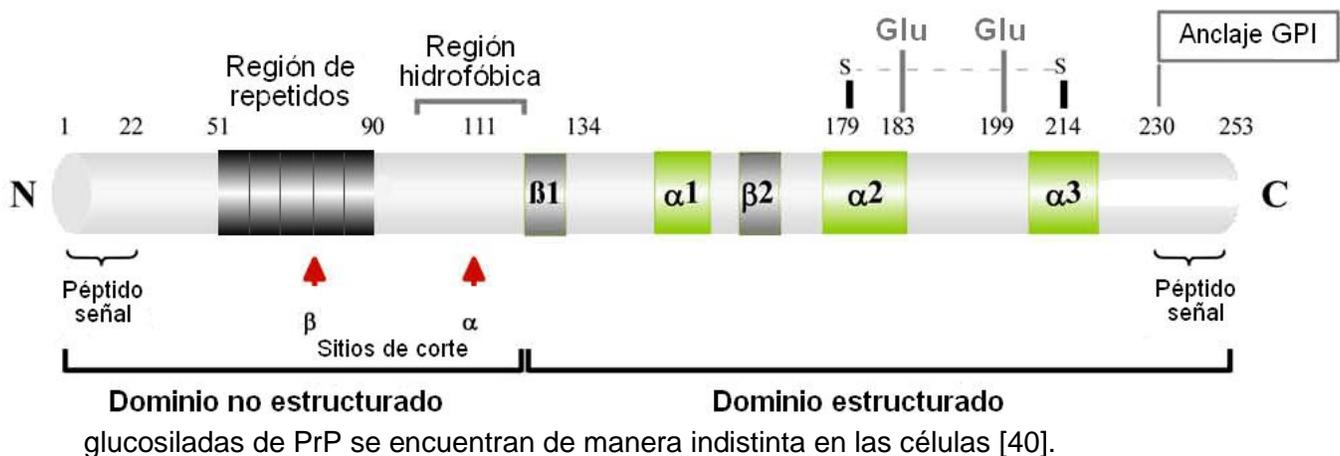


Figura 2: Esquema lineal de la estructura de la proteína PrP^C. El esquema ilustra los dominios de la proteína, así como los sitios de corte enzimático, los sitios de glucosilación y los residuos que forman puentes disulfuro. Modificada de [40].

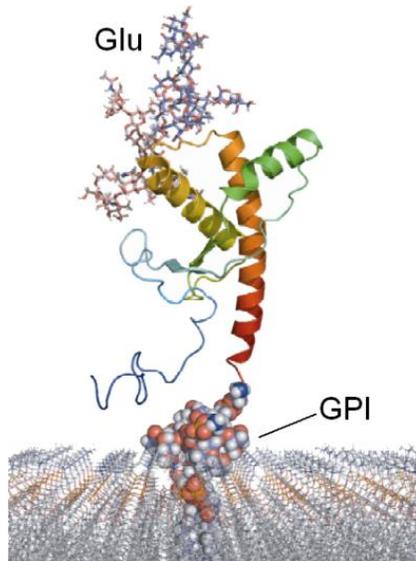


Figura 3: Forma madura de PrP^C. Representación de PrP^C madura anclada a la membrana celular a través del anclaje GPI (representado por esferas). La glucosilación (Glu) está señalada por las ramificaciones de la parte superior. Modificada de [39].

3.3.2 Localización

PRNP se expresa en diversos tejidos en todas las especies conocidas de mamíferos, sin embargo, su expresión principal ocurre en el sistema nervioso central, principalmente en neocorteza y cerebelo, así como en los testículos [40, 44]. Más específicamente, se sabe que la proteína se expresa en diversas poblaciones neuronales del hipocampo, tálamo y neocorteza, así como en células gliales. Dentro de las neuronas se ha encontrado que PrP^C se encuentra predominantemente en axones y dendritas, aunque no como parte de las vesículas sinápticas [44].

Fuera del SNC, es importante la presencia de PrP^C en células del sistema inmunológico (linfocitos T y B, células NK y células dendríticas) [40].

3.3.3 Funciones

Actualmente no se conoce con certeza la función de PrP [45]. Esto se debe, en parte, a que por mucho tiempo el estudio de la proteína prión se concentró en el estudio de la isoforma patogénica PrP^{Sc}, más que en las funciones fisiológicas de PrP^C [42]. Sin embargo, el alto nivel de conservación en este gen entre las secuencias de mamíferos sugiere que éste ha retenido una función importante a través de la evolución [46].

Actualmente hay diversas líneas de investigación que proponen algunas funciones para PrP^C, sin embargo, los estudios no han logrado ser concluyentes. A continuación se presentan algunas de las funciones propuestas para PrP^C.

3.3.3.1 *Actividad antiapoptótica.*

Diversos estudios con cultivos celulares [47, 48], levaduras [49] y ratones [50, 51] sugieren que PrP^C protege a las células de la apoptosis inducida por Bax. Aún no es claro el mecanismo por el que esto puede ocurrir, sin embargo los autores plantean seis opciones (Fig. 4): 1) PrP unida a la membrana podría interactuar con receptores transmembranales, iniciando cascadas de señalización que inhibieran la translocación mitocondrial, oligomerización o cambios conformacionales de Bax; 2) formas citosólicas de PrP podrían producir efectos similares al interactuar directamente con Bax; 3) PrP podría inhibir proteínas pro-apoptóticas del grupo BH3, responsables de la activación de Bax; 4) PrP podría aumentar la interacción de Bax con proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL; 5) PrP podría suprimir los efectos corriente abajo en la vía de Bax (liberación de citocromo c, activación de Apaf-1 y caspasas) y 6) durante su paso por el retículo endoplásmico, PrP podría alterar los efectos de Bax en este organelo, mediante alteraciones en el calcio intracelular y la respuesta de proteínas no plegadas [42].

Aunque esta actividad antiapoptótica se relacionó inicialmente con neuroprotección, también se ha observado que confiere resistencia al tratamiento contra células tumorales ya que también protege a las células de la apoptosis inducida por TNF- α , por lo que se ha relacionado a PrP con procesos cancerosos [40].

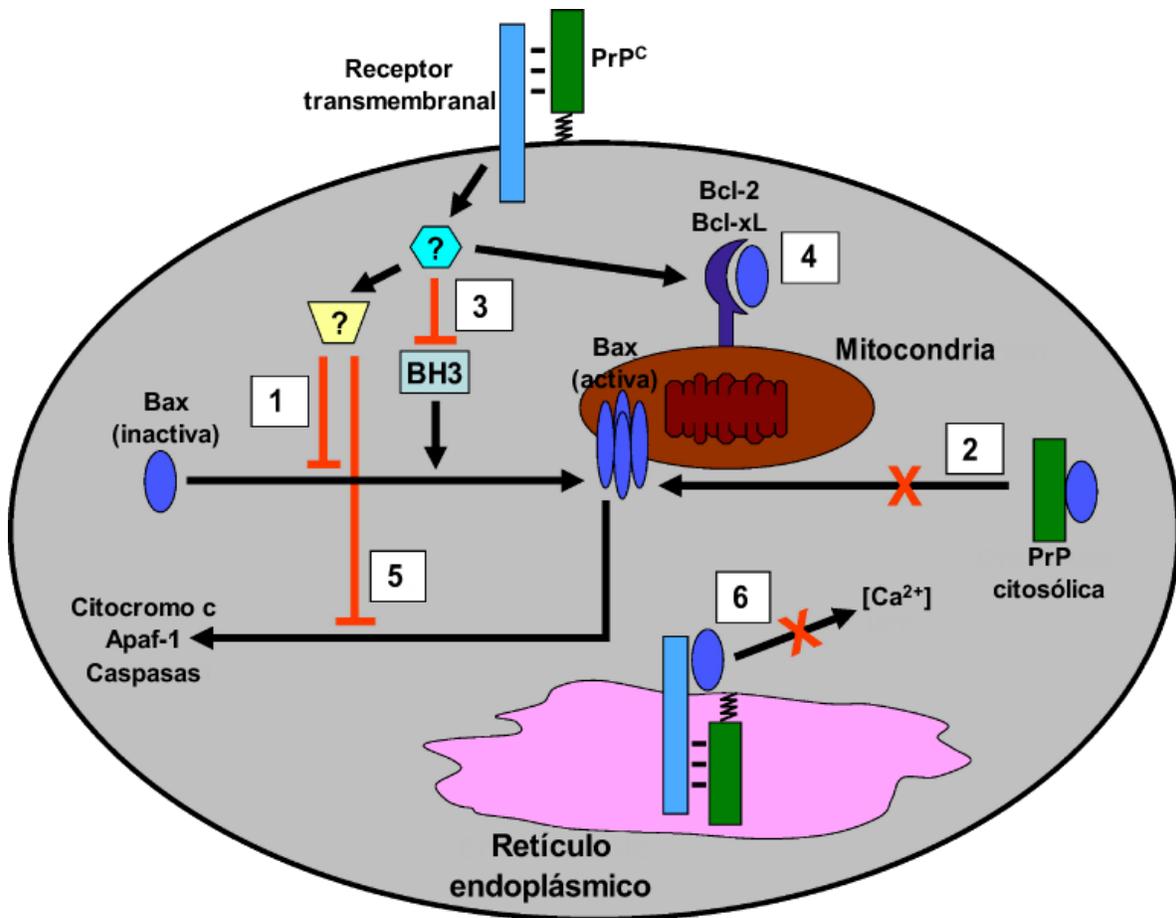


Figura 4: Actividad anti-apoptótica de PrP. Se ha sugerido que PrP podría evitar la apoptosis inducida por Bax. Esta acción podría ser llevada a cabo mediante interacción con receptores transmembranarales (1), acción directa de formas citosólicas de Prp (2), inhibición de proteínas del grupo BH3 (3), aumento de la actividad de Bcl-2 y Bcl-XL (4), supresión de los efectos de la vía de Bax (5) o efectos desde el retículo endoplásmico (6). Modificada de [42].

3.3.3.2 Actividad antioxidante.

También se ha señalado que PrP^C puede participar en proteger a las células frente al estrés oxidativo. Esto se basa principalmente en la observación de que las neuronas de ratones *knock-out* para *Prnp* son más sensibles al daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, iones de cobre y xantina oxidasa [52, 53].

Se plantea que este efecto antioxidante se debe a la regulación positiva de las actividades de proteínas secuestradoras de especies reactivas de oxígeno como la

Superóxido Dismutasa dependiente de cobre-zinc (Cu-Zn SOD), o bien a que la propia PrP exhiba una ligera actividad SOD dependiente de cobre, aunque esta última idea ha sido cuestionada [42].

3.3.3.3 *Regulación por cobre*

PrP^C es capaz de unir hasta cuatro iones Cu²⁺ en la región de repeticiones de octapéptidos, con una alta afinidad [54]. Esta unión produce cambios conformacionales en la cola flexible amino-terminal y, en algunos casos, la salida de PrP^C de las balsas lipídicas para su endocitosis mediante vesículas de clatrina [55].

Diversos ensayos señalan que es poco probable que PrP^C esté involucrada en las vías principales de entrada y salida de cobre de células y tejidos, aunque no se descarta la posible influencia del cobre como modulador de otras funciones de PrP [42].

3.3.3.4 *Señalización transmembranal*

Dado que la mayor parte de PrP se encuentra en la superficie celular, se ha sugerido que esté involucrada en procesos de señalización. Esta teoría también se justifica por la ubicación de la proteína en balsas lipídicas de la membrana, sitios conocidos como plataformas para procesos de transducción de señales [56]. Sin embargo, ya que la unión a la membrana es a través de un grupo GPI, haciendo que la cadena peptídica sea totalmente extracelular, es necesario que PrP^C interactúe con otras proteínas para lograr la transducción de señales hacia el interior de la célula [42].

Se ha observado que la interacción de PrP^C con fyn, una tirosina cinasa no receptora, desencadena una señal neuroprotectora mediante la enzima NADPH oxidasa y cinasas de regulación extracelular (ERK). Asimismo, se ha observado que PrP^C protege del daño isquémico, mediante una ruta dependiente de Akt [42].

Por otro lado, se ha relacionado a PrP^C con vías de señalización involucradas en el crecimiento neuronal y la neuritogénesis mediante la interacción con la molécula de adhesión de células neurales (N-CAM) [42].

3.3.3.5 Participación en la sinapsis

En un experimento se demostró que la incubación neuronal en presencia de PrP induce la rápida elaboración de axones y dendritas, aumentando el número de contactos entre ellos. Adicionalmente se han observado altas concentraciones de PrP^C en la placa neuromuscular, donde su presencia potencializa la liberación de acetilcolina [42]. Estos hallazgos sugieren que PrP^C tiene un papel regulatorio en el establecimiento de la sinapsis, además de la protección antioxidante que se discutió anteriormente.

Las anormalidades neurológicas de ratones *knock-out* para *Pnp*, como alteraciones en la organización de fibras nerviosas [57], ritmo circadiano [58] y aprendizaje espacial [59], así como la patología sináptica observada en pacientes con enfermedades priónicas sugieren la participación de PrP^C en la sinapsis.

3.3.3.6 Adhesión celular

Se ha observado que PrP^C interactúa con diversas moléculas de adhesión. Ya se comentó anteriormente la interacción con N-CAM, que promueve la neuritogénesis mediante la activación de la cinasa fyn [60].

También se ha demostrado la interacción de PrP^C con laminina, una componente principal de membranas basales. En el sistema nervioso central, esta unión puede estar relacionada con proliferación celular, neuritogénesis y migración celular [42].

Otros experimentos han encontrado que la expresión de PrP^C intensifica la agregación de células de neuroblastoma, aunque el mecanismo aún no se ha explicado [61].

3.4 Genes relacionados con *PRNP*

Muy cerca del gen *PRNP*, dentro del cromosoma 20, se encuentran los genes *PRND* y *PRNT*, formando el llamado *locus PRNP* (Fig. 5), que comprende alrededor de 55 kb [62]. Estos tres genes, junto con el gen *SPRN*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q26.3) conforman la familia de genes PrP (PrP-GF) [27, 37, 63].

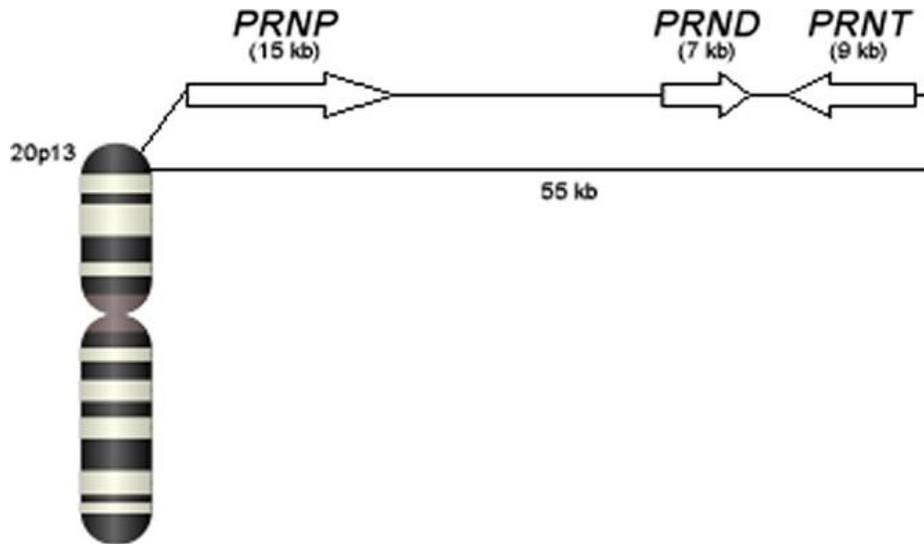


Figura 5: Esquema del locus PRNP. Esquema de la región de 55 kb en el cromosoma 20 humano que incluye los genes *PRNP*, *PRND*, y *PRNT*.

PRND es el gen más cercano a *PRNP* y, como éste, se compone por dos exones, estando el marco abierto de lectura completamente dentro del segundo exón [26]. Este gen codifica la proteína Doppel (Dpl), de 179 aminoácidos, que también está formada por tres estructuras α -hélice y dos láminas β -plegada, teniendo un 25% de identidad de aminoácidos con la región globular de *PRNP* (Fig. 6).

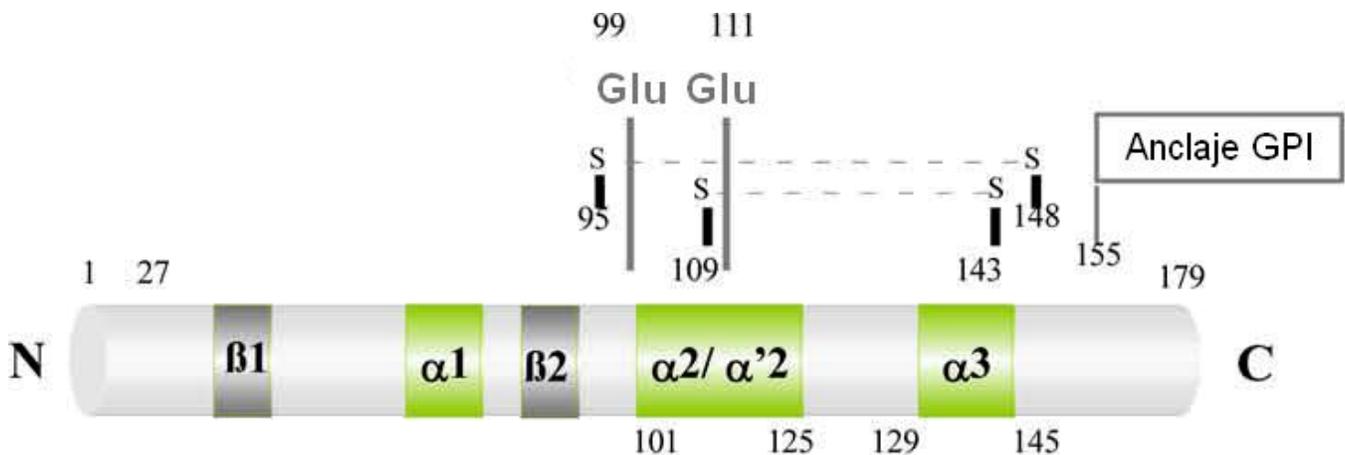


Figura 6: Esquema lineal de la estructura de la proteína Dpl. Al igual que PrP^{C} , Dpl tiene un dominio estructurado que consiste de tres hélices α y dos laminas β cortas. También se observan en Dpl sitios de glucosilación y la formación de puentes disulfuro. Modificada de [40].

Dpl se expresa normalmente en diversos tejidos durante el desarrollo fetal y en muy bajas cantidades en cerebros de adultos [40]. Diversos experimentos señalan que Dpl tiene un efecto tóxico cuando se presenta en el sistema nervioso central, causando, por ejemplo, ataxia por daño a células de Purkinje [64]. Este efecto dañino de Dpl se ve contrarrestado por la acción de PrP^C, lo cual sugiere que estas dos proteínas tienen funciones opuestas [44].

A 3 kb en dirección 3' de *PRND* se encuentra *PRNT*, el último gen del *locus PRNP*. Este gen sólo se ha encontrado en primates [65] y se expresa exclusivamente en tejido de testículo adulto [40]. Actualmente se plantea que este gen, rico en elementos repetitivos de tipo LINE1 (elementos nucleares dispersos largos tipo 1) y MER2 (elementos medianamente repetidos tipo 2) [62], no codifica una proteína [40, 66].

Otro integrante de la PrP-GF se encuentra fuera del *locus PRNP*, concretamente en el cromosoma 10 en humanos: el gen *SPRN*. Al igual que todos los miembros de la familia, este gen se compone por dos exones y el marco abierto de lectura completo está contenido en el segundo. *SPRN* codifica la proteína de 151 aminoácidos llamada Shadoo, (de *Sho*, que significa sombra en japonés) [26, 44]. Estructuralmente, es notable la similitud entre Shadoo y el extremo N-terminal de PrP^C, incluyendo una región de repetidos, una región hidrofóbica, un sitio de N-glucosilación y un anclaje GPI con el que se une al exterior de la membrana de células nerviosas (Fig. 7) [40, 63].

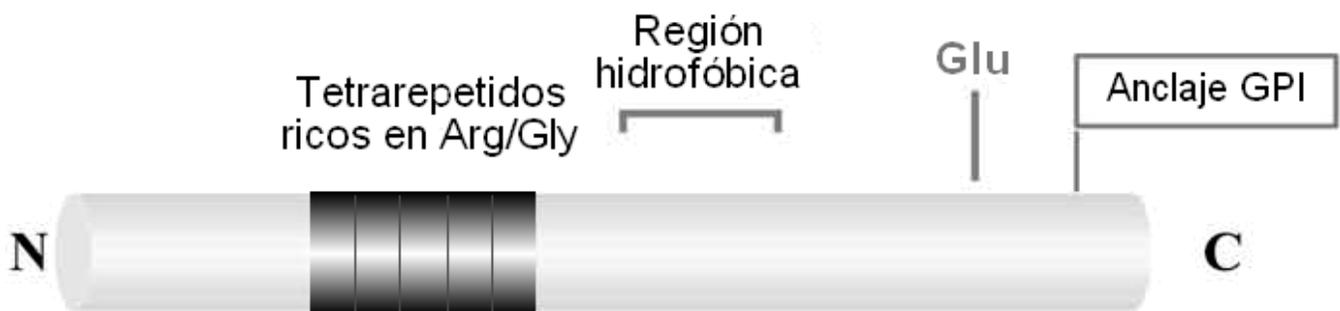


Figura 7: Esquema lineal de la estructura de la proteína Shadoo. Se observa en Shadoo una región de repetidos y una región hidrofóbica bien conservada, de manera similar a lo encontrado en PrP^C. Modificada de [40].

Estas similitudes motivaron que se buscara si Shadoo también llevaba a cabo la función protectora de PrP^C frente al daño provocado por Dpl, hecho que se comprobó en

un estudio en el que también se detectó que la expresión de Shadoo disminuye significativamente cuando ocurre el cambio de PrP^C a PrP^{Sc}, lo cual podría contribuir a la progresión de las enfermedades priónicas [63].

Estos hallazgos fundamentan un modelo de interacción entre las proteínas de la familia de PrP. En este modelo se propone que tanto PrP^C como Shadoo conviven en la membrana, teniendo una función de neuroprotección (Fig. 8). En ausencia de PrP^C, la proteína Shadoo podría cubrir esta función, aunque de manera menos eficaz, lo cual explicaría el fenotipo aparentemente sano de ratones *knock-out* para *Prnp* [67]. Por último, la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} lleva a la pérdida de la función neuroprotectora, así como la ganancia de una función tóxica, ocasionando una neurodegeneración que es agravada por la disminución de la expresión de Shadoo [44].

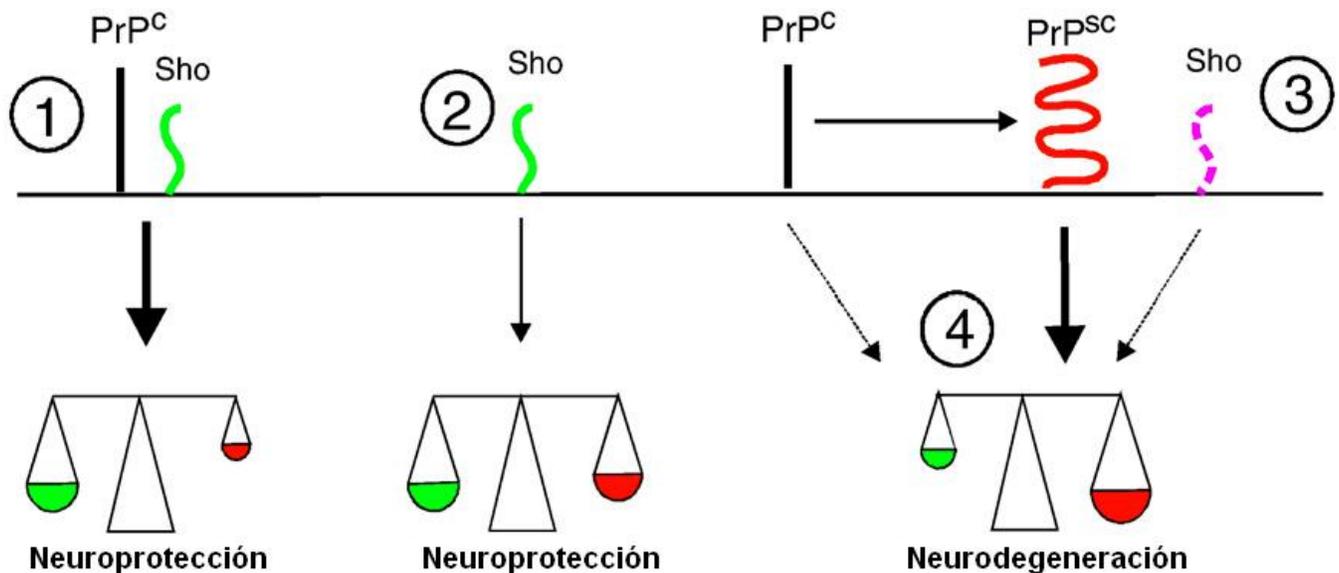


Figura 8: Modelo de interacción entre PrP^C y Shadoo. Se propone que PrP^C y Shadoo tienen un efecto neuroprotector que se observa incluso en ausencia de PrP^C, pero que se pierde con la conversión a PrP^{Sc} y la disminución en la expresión de Shadoo, causando neurodegeneración.

Modificada de [44].

3.5 Conversión PrP^C-PrP^{Sc} y desarrollo de las enfermedades priónicas

Es ampliamente aceptado que el evento central en la aparición de las enfermedades priónicas es la conversión de la forma celular de la proteína prión (PrP^C) a la isoforma patológica PrP^{Sc} [68, 69, 70]. Como se ha comentado antes, PrP^C es una proteína formada principalmente por estructura de α -hélice, soluble y sensible a la acción de proteasas. Sin embargo, la re-estructuración post-traduccional del extremo N-terminal, formado por una cola no estructurada y una α -hélice en PrP^C, para formar nuevas estructuras de lámina β , ocasiona que ésta estructura se vuelva predominante (43% de la estructura total) [69, 71]. Al adquirir esta nueva configuración, la proteína se vuelve insoluble y parcialmente resistente a proteasas, además de adquirir la capacidad de agregarse. Esta proteína ha sido detectada en cerebros de humanos y animales con enfermedades priónicas y se ha demostrado que es el agente transmisible de éstas [69]. El cambio entre PrP^C y PrP^{Sc} es poco probable en condiciones normales al estar energéticamente desfavorecido [69, 72].

La hipótesis de “únicamente proteína”, postulada por Prusiner, propone que el agente proteico PrP^{Sc} dirige su propia propagación [69, 73]. Existen dos modelos que explican cómo PrP^{Sc} dirige esta propagación: el modelo de replegamiento y el modelo de la semilla [70].

El modelo de replegamiento (Fig. 9) postula la interacción entre la PrP^C endógena y PrP^{Sc} exógena introducida, o bien producida esporádicamente. La unión produce eventualmente un heterodímero en el que PrP^{Sc} actúa como molde para el replegamiento de PrP^C en la forma patológica, cambio impedido en condiciones normales [69, 72, 73].

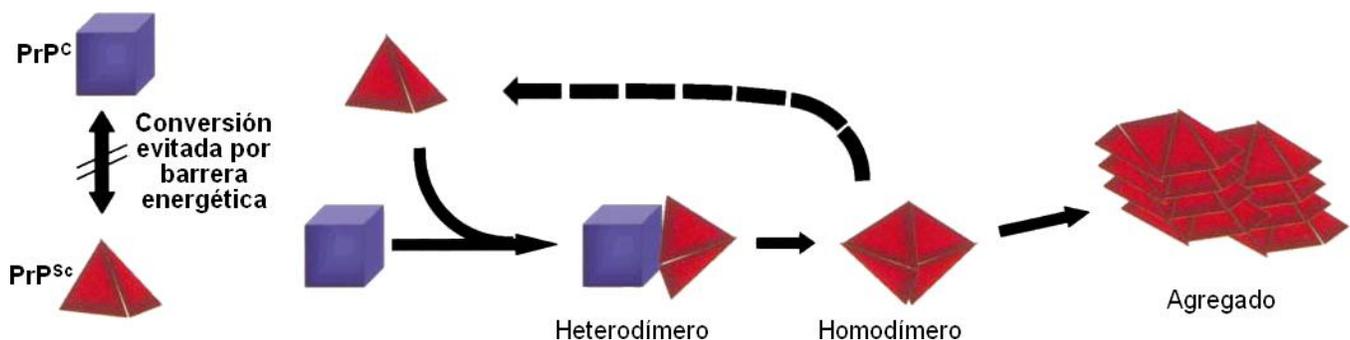


Figura 9: Modelo de replegamiento. Requiere de la interacción entre PrP^{Sc} y PrP^C, que disminuye la barrera energética para el cambio a la conformación patológica. Modificada de [72].

El modelo de la semilla, también llamado de nucleación-polimerización (Fig. 10), propone que PrP^{C} y PrP^{Sc} se encuentran en un equilibrio termodinámico que favorece la forma PrP^{C} . Únicamente si varias moléculas de PrP^{Sc} se ordenan para formar una semilla (proceso lento y reversible), éstas podrán reclutar más monómeros de PrP^{Sc} hasta llegar a formar un agregado amiloide grande en el que PrP^{Sc} se estabiliza, en un proceso irreversible. La semilla también podría ser adquirida exógenamente. Finalmente, la fragmentación de estos agregados produciría nuevas semillas que podrían reclutar más PrP^{Sc} [72].

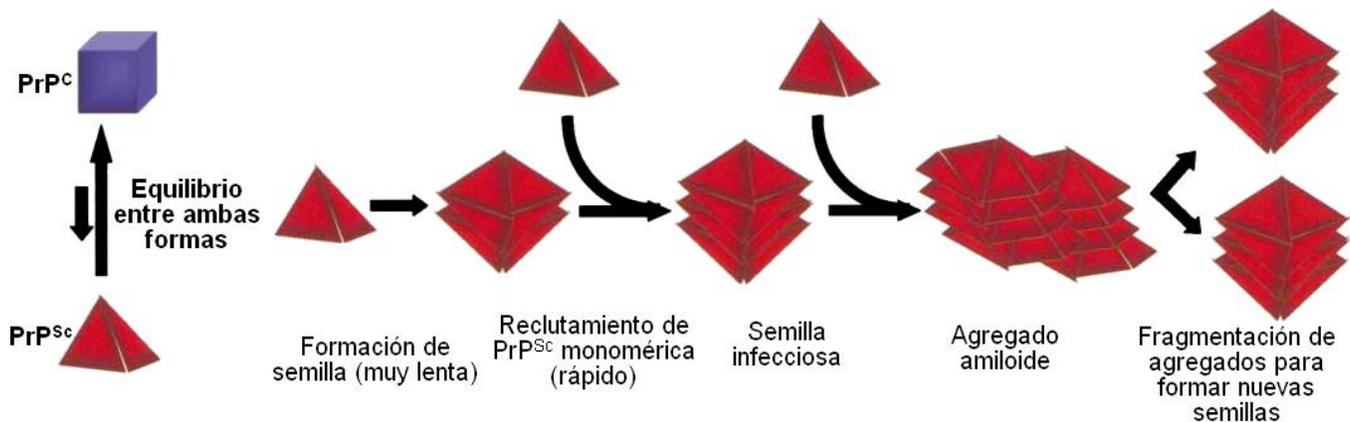


Figura 10: Modelo de la semilla. La agregación lenta y reversible de monómeros de PrP^{Sc} conduce a la formación de una semilla que inicia el reclutamiento rápido de más monómeros. Dicha semilla puede a su vez fragmentarse para formar nuevas semillas. Modificada de [72].

Recientemente se ha sugerido que, mientras que los intermediarios oligoméricos son las partículas responsables del daño neuronal y la transmisibilidad de las enfermedades priónicas, estructuras más grandes, como protofibrillas y fibrillas, son menos tóxicas que los intermediarios e incluso pueden adquirir funciones protectoras como la observada en PrP^{C} [69].

3.6 Enfermedades priónicas humanas

Las enfermedades priónicas, también llamadas encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas crónicas, irreversibles y fatales que afectan a humanos y animales. Como grupo se caracterizan por ocasionar demencias de rápida progresión, así como por la presencia de PrP^{Sc} en el sistema nervioso de los individuos afectados [71].

Estas enfermedades pueden ser clasificadas según su etiología como esporádicas (causa desconocida), familiares (heredadas) o adquiridas (transmitidas horizontalmente), lo cual las hace únicas entre las enfermedades conocidas [1, 71].

En el humano se han clasificado en cuatro grupos principales, basándose en sus características fenotípicas [1]. Estos son: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio fatal (FI) y *kuru*. A continuación se presenta una descripción de las características relevantes de cada una de las enfermedades priónicas humanas.

3.6.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

Los pacientes con CJD presentan una severa demencia cortical, precedida de confusión y pérdida de la memoria, además de ataxia y mioclonías. [1]. La neuropatología característica de esta enfermedad es la presencia de degeneración espongiforme por la formación de vacuolas en células de la materia gris cortical (Fig. 11). Estas vacuolas miden entre 5 y 25 μm de diámetro en etapas iniciales de la enfermedad y llegan a medir hasta 100 μm en etapas avanzadas [1]. En el 5-10% de los casos también se ha observado depósitos de placa amiloide [3].

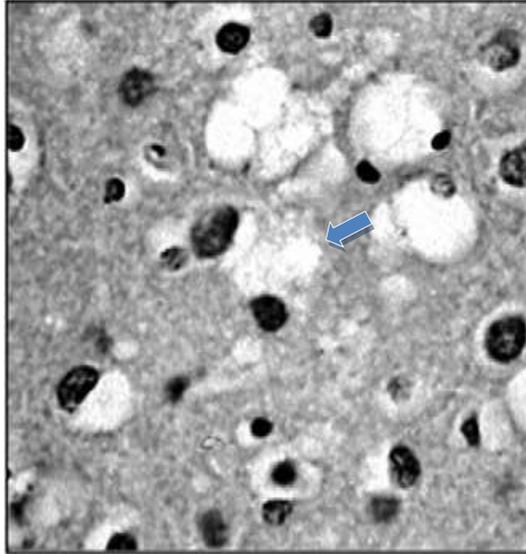


Figura 11: Neuropatología observada en CJD. Se muestra un corte de tejido cerebral teñido con hemotoxilina y eosina donde se indica con una flecha la degeneración espongiiforme (vacuolación) del neuropilo característica de CJD. [1].

A su vez, este grupo se divide en cuatro subgrupos en función de las diferentes etiologías.

3.6.1.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD)

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD) es la más frecuente de las enfermedades priónicas humanas, con una incidencia de 1-2 casos por millón. Se ha observado una distribución uniforme con respecto al género y se presenta comúnmente entre los 55 y 75 años de edad, aunque se han reportado casos de individuos afectados con edades inferiores a los 20 años [3].

Su síntoma clínico principal es la demencia de rápida progresión acompañada de disfunción cerebelar que incluye ataxia y anomalías visuales, del habla y la marcha. En etapas terminales, los pacientes se vuelven insensibles a estímulos externos, en una condición conocida como mutismo acinético [3].

Las observaciones clínicas han permitido definir diferentes subtipos de esta variante de la enfermedad, que son: a) el de Brownell y Oppenheimer, que representa alrededor del 25% de los casos, en el que se observa predominantemente una ataxia cerebelar en etapas tempranas y demencia en etapas tardías [1]; b) el tipo amaurótico, o de

Heidenhain, que se caracteriza por demencia de rápida progresión de corta duración, mioclonías y alteraciones visuales como alucinaciones, agnosia visual y ceguera cortical; c) la forma talámica que se caracteriza por demencia acompañada de desórdenes de movimiento y d) la variante panencefálica, reportada en población japonesa, en la que se observa gran cantidad de células en el líquido cefalorraquídeo y daño de la materia blanca con una progresión más lenta [74].

3.6.1.2 *Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (fCJD)*

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (fCJD), o también llamada genética (gCJD), es una de las enfermedades priónicas hereditarias con patrón de herencia autosómica dominante. Este grupo, que contribuye a poco menos del 15% de los casos de TSEs, se caracteriza por encontrarse mutaciones en el gen *PRNP* que ocasionan que la proteína sintetizada sea inestable y sufra el cambio conformacional a la variante patogénica [1, 73]. La fCJD se ha asociado con inserciones de 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 9 repetidos de octapéptidos, así como mutaciones en los codones 178, 180, 183, 196, 200, 203, 208, 210, 211 y 232, siendo más importantes las mutaciones E200K, I210V, D178N, V180I y T188R. La mutación D178N también está asociada con el Insomnio Familiar Fatal y actualmente se sabe que el polimorfismo del codón 129 (M/V) resulta determinante en el fenotipo de la enfermedad, requiriéndose el haplotipo D178N-129V para el desarrollo de fCJD [1, 3]. Más adelante se presentará una descripción más detallada de estas mutaciones.

3.6.1.3 *Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iCJD)*

La primera descripción de un caso de iCJD fue en 1974 en una persona que había recibido un trasplante de córnea del cadáver de un paciente con CJD [75]. A partir de entonces se han reportado diversos casos de transmisión iatrogénica de la enfermedad por intervenciones de neurocirugía, implante de electrodos para electroencefalogramas, trasplantes de córnea y duramadre, así como tratamientos con hormona de crecimiento y gonadotropina derivadas de pituitaria de cadáveres [76]. Recientemente, se demostró la presencia de PrP^{Sc} en la orina de hámsters infectados con *scrapie*, por lo que surgió preocupación por el uso de tratamientos con hormonas derivadas de orina humana,

aunque hasta el momento no se han reportado casos de TSEs debidas a estos productos [45].

El descubrimiento de este tipo de transmisión obligó a modificar los procedimientos seguidos para los injertos y esto, junto con la introducción de terapias con hormonas recombinantes, casi ha eliminado la probabilidad de transmisión de esta enfermedad. Sin embargo se plantea que podría ocurrir un aumento en la incidencia de iCJD por los casos en los que el tiempo de incubación fuera muy largo [3].

A diferencia de los casos esporádicos, los pacientes con iCJD presentan más ataxia cerebelar y menos problemas cognitivos además de con patrones de onda lentos y difusos en lugar de complejos de onda aguda [1].

3.6.1.4 Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob vCJD

En abril de 1996 [77] se reportaron en el Reino Unido los primeros 10 casos de una enfermedad parecida a los casos reportados de CJD, pero con algunas diferencias: los pacientes tenían entre 16 y 39 años de edad, mucho más jóvenes que los pacientes con sCJD (55-75 años), además de presentar inicialmente síntomas psiquiátricos en lugar del cuadro típico de ataxia/demencia [3, 76]. A nivel de neuropatología también se encontraron diferencias, observándose en estos pacientes la presencia de placas densas formadas por PrP rodeadas por lesiones espongiiformes, que fueron llamadas “placas floridas” (Fig. 12) [1, 3]. Esta nueva enfermedad fue llamada variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, o vCJD.

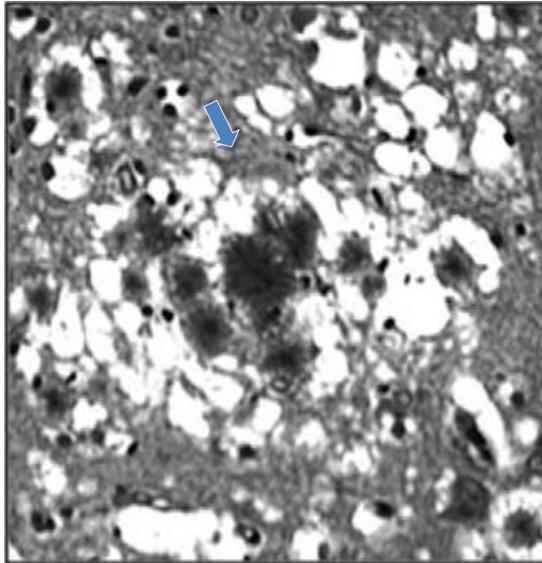


Figura 12: Neuropatología observada en vCJD. Se observan las “placas floridas” (flecha azul) características de vCJD, que consisten en depósitos de tipo amiloide con un núcleo denso de PrP^{Sc} rodeados por degeneración esponjiforme [1].

En estos casos se ha planteó la posibilidad de que esta enfermedad estuviera relacionada con la encefalopatía esponjiforme bovina (BSE), conocida como enfermedad de las vacas locas, que habría sido transmitida al humano por el consumo de carne contaminada proveniente de animales enfermos [1, 77]. Actualmente se cuenta con evidencia suficiente para respaldar la relación entre ambas enfermedades, ya que se demostró que en los casos de vCJD como BSE, predomina la forma diglucosilada de PrP^{Sc}, mientras que en sCJD la proteína se encuentra predominantemente monoglucosilada [1]. Por otro lado se demostró que las lesiones provocadas por la exposición a derivados de BSE en ratones transgénicos que expresan PrP humana son similares a las observadas en vCJD [76].

Hasta la fecha se han reportado más de 200 casos de vCJD, sobre todo en Reino Unido y Francia [1]. Los pacientes presentan síntomas psiquiátricos como apatía, depresión, agresividad e insomnio, siendo común encontrar combinaciones de dos de estos. Como se comentó anteriormente, vCJD afecta a pacientes más jóvenes (Fig. 13) y tiene un curso clínico más largo que sCJD, extendiéndose un promedio de 18 meses [3].

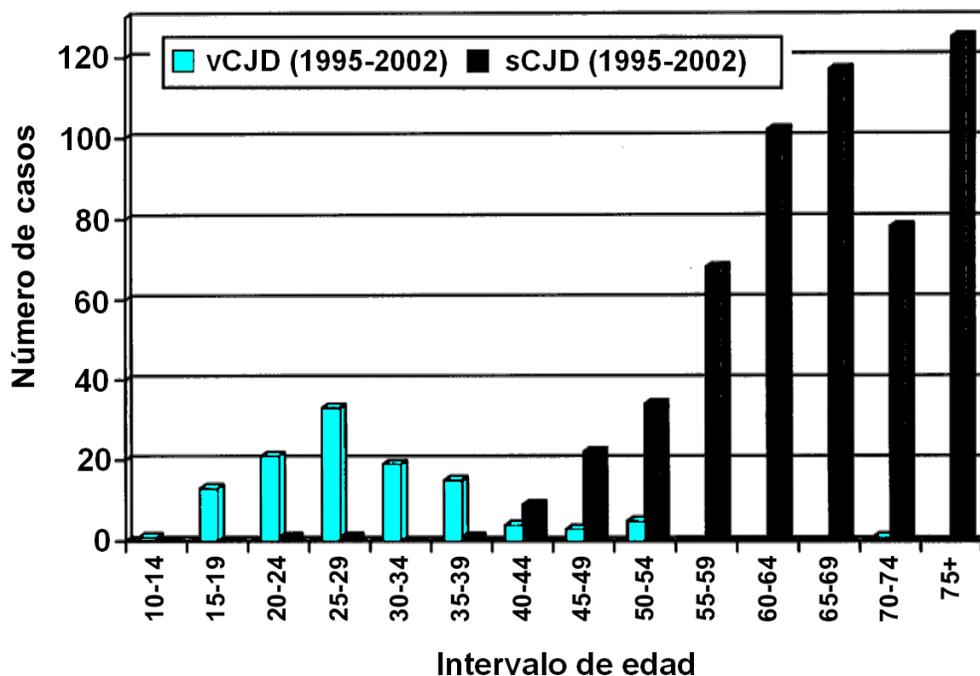


Figura 13: Comparación de las edades de inicio de los casos de vCJD y sCJD.

Edad de inicio de los casos de vCJD y sCJD reportados entre 1995 y 2002. Se observa claramente un inicio más temprano en los casos adquiridos [76].

Además de la exposición a carne contaminada, se han reportado al menos cuatro casos de transmisión secundaria de vCJD a través de transfusión sanguínea [78]. Esta posibilidad de transmisión secundaria, así como la posible aparición de casos de vCJD con tiempos de incubación largos mantienen activa la alarma sobre un eventual aumento en la incidencia de esta enfermedad.

3.6.2 Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

Este tipo de TSE es siempre familiar y se ha asociado con mutaciones puntuales en los codones 102, 105, 117, 131, 145, 160, 198, 202, 212 y 217, así como inserciones de números elevados de repetidos de octapéptidos en el gen *PRNP* [1]. La herencia es autosómica dominante [3].

Esta enfermedad tiene una incidencia de 1 por cada 100 millones de habitantes y se caracteriza por un inicio entre los 30 y 60 años de edad y una progresión lenta de entre 3.5 y 9.5 años [3]. Inicialmente, los pacientes presentan marcha atáxica y disartria,

seguidas por diversos síntomas piramidales y extrapiramidales hasta el desarrollo de demencia [1, 3].

El diagnóstico definitivo de esta enfermedad se basa en su neuropatología, que consiste en depósito de placas multicéntricas formadas por PrP que pueden estar rodeadas por lesiones espongiiformes pequeñas (Fig. 14).

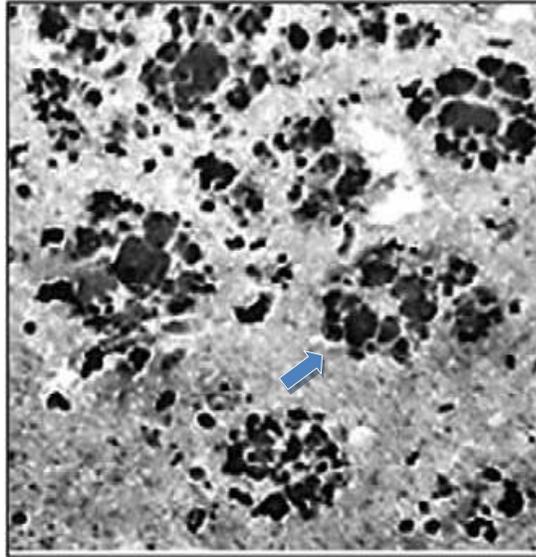


Figura 14: Neuropatología observada en GSS. Placas multicéntricas, PrP-positivas características de GSS. Estas estructuras se observan principalmente en el cerebelo, pero también están dispersas en todo el encéfalo. [1].

3.6.3 Insomnio fatal

Originalmente se describía únicamente como una enfermedad familiar, sin embargo actualmente se sabe que también ocurre de manera esporádica. En ambos casos los pacientes presentan un insomnio intratable seguido de disautonomía, ataxia y signos piramidales y extrapiramidales, desarrollando demencia en las etapas tardías de la enfermedad [1]. Esta enfermedad se presenta entre los 20 y los 72 años (49 en promedio) y tiene una duración entre 8 y 72 meses (promedio de 18 meses) [3].

Neuropatológicamente, esta enfermedad se caracteriza por la pérdida neuronal y una marcada astrogliosis en el tálamo, olivas inferiores y, en menor proporción, en el cerebelo (Fig. 15) [1]. También se observan depósitos de PrP en la capa molecular del cerebelo [3].

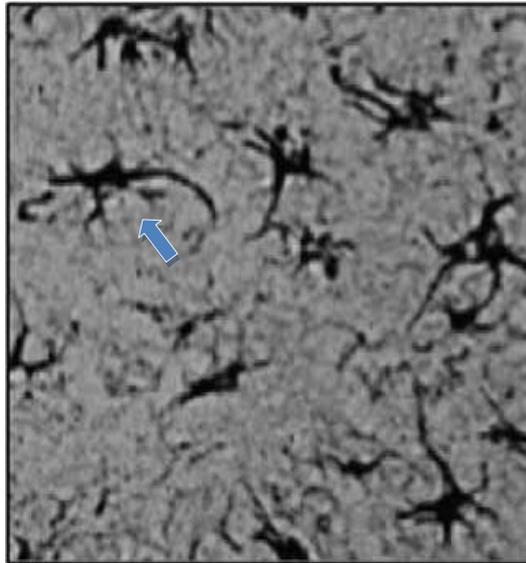


Figura 15: Neuropatología observada en Insomnio Fatal. Hipertrofia y proliferación de astrocitos (flecha) demostrada mediante anticuerpos contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Aunque este rasgo está presente en todas las enfermedades priónicas, en los casos de insomnio fatal se localiza en el núcleo anterior y dorsomedial del tálamo y el tronco encefálico [1].

A continuación se detallan las dos variantes de esta enfermedad.

3.6.3.1 Insomnio familiar fatal (FFI)

La forma familiar del insomnio fatal es causada por la mutación D178N en el gen *PRNP* cuando está asociada al alelo metionina en el codón 129 (129M). Como se mencionó anteriormente, esta misma mutación causa fCJD cuando está asociada al alelo 129V [3].

Esta enfermedad se hereda de manera autosómica dominante y afecta en la misma proporción a individuos con genotipos 129M/M y 129M/V, aunque la presentación de la enfermedad pueda ser diferente entre ellos: en los individuos homocigotos para metionina la enfermedad tiene un curso más corto, presentando insomnio, mioclonías y disfunción autonómica más severos, mientras que en individuos heterocigotos predominan la ataxia, disartria y convulsiones [3].

3.6.3.2 *Insomnio fatal esporádico sFI*

El primer caso esporádico de insomnio fatal se reportó en 1999 en un paciente que presentaba las características típicas del FFI sin presentar la mutación D178N en el gen *PRNP* [79]. A partir de ahí, se han reportado más de 20 casos de sFI y todos los individuos han sido homocigotos para metionina en el codón 129 [3].

Los estudios histopatológicos, el análisis molecular de la conformación de PrP y sus pruebas de transmisibilidad confirmaron que se trataba de la misma cepa molecular de prión causante de FFI [79]. Actualmente se sabe que esta cepa (MM2) también está presente en algunos casos de sCJD, de características clínicopatológicas muy distintas, lo cual indica que existen factores adicionales al polimorfismo M129V que determinan la cepa priónica así como el fenotipo [3].

3.6.4 *Kuru*

Como se discutió anteriormente, el estudio del *kuru* ha sido fundamental para el entendimiento de las enfermedades priónicas. Esta enfermedad se ha presentado únicamente en poblaciones del distrito de Okapa, en la región montañosa del este de Papúa Nueva Guinea, donde se han registrado más de 2700 casos desde 1957 [76].

Esta enfermedad fue transmitida por rituales de canibalismo ritual llevadas a cabo por en la región, quienes comían a sus familiares muertos en señal de duelo y respeto. Las mujeres y los niños fueron afectados mayormente ya que éstos consumían los órganos internos, incluido el cerebro, mientras que los hombres adultos comían los músculos. Se ha propuesto que los casos de *kuru* se originaron a partir de un caso de sCJD [3].

La disminución en la incidencia de *kuru* a partir de la prohibición del canibalismo de mediados de los años 50 es una prueba del tipo de transmisión de la enfermedad y la ausencia de casos en niños nacidos después de la prohibición sugiere que no existe transmisión a través de la leche materna (muchos fueron alimentados por mujeres infectadas) [76]. Sin embargo, este último punto se ha puesto en duda tras demostrarse la presencia de PrP en leche de ovejas expuestas a *scrapie* [80].

Se han descrito tres etapas de la enfermedad: ambulante (el paciente puede caminar), sedentario (el paciente puede sostenerse estando sentado) y terminal (el paciente es incapaz de sentarse independientemente). Estas etapas pueden estar precedidas por

dolor de cabeza y de articulaciones. En contraste con los casos de sCJD, los signos clínicos distintivos del *kuru*, como temblores (*kuru* significa “temblor”), ataxia y movimientos coreiformes, son de origen cerebelar. En algunos pacientes se presenta también demencia, sin embargo, ésta aparece en etapas avanzadas de la enfermedad [3, 76].

Las observaciones histopatológicas muestran algunas características similares a las de otras enfermedades priónicas, tales como espongirosis, pérdida neuronal, astrogliosis y depósitos de PrP^{Sc}, presentándose variablemente en el sistema nervioso central. Sin embargo, la característica del *kuru* es la presencia de depósitos esféricos formados por anillos concéntricos, conocidos como placas de *kuru* [3].

Aunque la incidencia ha disminuido, aún se presentan casos de *kuru* en los cuales el tiempo de incubación ha sido superior a los 50 años. Cabe destacar que estos pacientes son heterocigotos en el polimorfismo del codón 129, lo cual confirmaría el efecto protector de este genotipo frente a las enfermedades priónicas adquiridas [81]. La epidemia de *kuru* llegó a matar aproximadamente al 2% de la población de la región en su punto más severo y algunos asentamientos se quedaron sin mujeres adultas [3]. Esto ejerció una presión selectiva por la cual se observa actualmente una frecuencia inusualmente alta del alelo valina en el codón 129 (Fig. 16), así como la existencia de otros polimorfismos protectores en esta población [12, 82]. Estos polimorfismos serán discutidos más adelante.

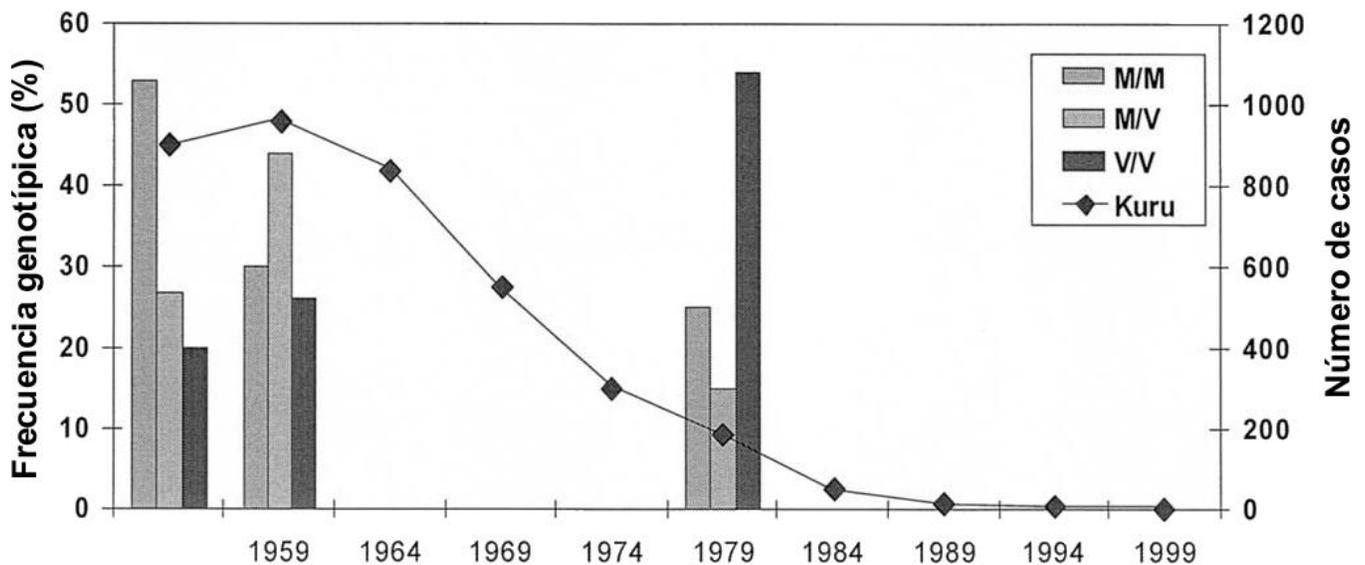


Figura 16: Evolución del genotipo en el codón 129 de *PRNP* en población expuesta al *kuru*. Curva de los casos de *kuru* y distribución de los genotipos del codón 129 en la población Fore de Papúa Nueva Guinea [82]

3.6.5 Consideraciones diagnósticas

Diagnosticar las enfermedades priónicas con base en sus características clínicas es difícil ya los signos y síntomas se sobrelapan considerablemente [73]. Además, el diagnóstico de estas enfermedades sólo es definitivo si se encuentra alguna de las mutaciones reportadas, o bien si se tiene la confirmación neuropatológica por autopsia, lo que requiere esperar hasta la muerte del paciente y es necesario contar con la autorización de los familiares. Otra opción es la biopsia cerebral, sin embargo no se recomienda, debido al riesgo que significa, a menos que tenga el propósito de confirmar el diagnóstico alternativo de una enfermedad tratable [83].

La presencia de mutaciones asociadas a las variantes familiares de enfermedades priónicas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas es un hallazgo confirmatorio de éstas, sin embargo cabe recordar que menos del 15% de los casos de TSEs se deben a mutaciones en el gen *PRNP* [1].

Esta dificultad diagnóstica ha motivado la proposición de diversos parámetros de diagnóstico que probablemente seguirán refinándose hasta que se cuente con

marcadores con la suficiente sensibilidad y especificidad y que, además, sean sencillos de obtener antes de la muerte del paciente (Tablas 1 y 2) [84].

Tabla 1: Evolución de los criterios diagnósticos para sCJD

Criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud en 1999 [83]		
Nivel	Hallazgo	Requerimiento
Posible	1. Demencia progresiva.	
	2. Encefalograma (EEG) atípico de la enfermedad o no realizado.	1-3: Mandatorio.
	3. Duración de la enfermedad menor a 2 años.	
	4. Mioclonías.	Al menos dos entre 4
	5. Alteraciones visuales o cerebelares.	y 7.
	6. Disfunción piramidal o extrapiramidal.	
	7. Mutismo acinético.	
Probable	1. Demencia progresiva.	1: Mandatorio.
	2. Mioclonías.	
	3. Alteraciones visuales o cerebelares.	Al menos dos entre 2
	4. Disfunción piramidal o extrapiramidal.	y 5.
	5. Mutismo acinético.	
	6. EEG típico de la enfermedad, sin importar la duración de la enfermedad.	
	7. Presencia de proteína 14-3-3 en líquido cefalorraquídeo (LCR), con una duración de la enfermedad menor a dos años.	Al menos uno entre 6 y 7.

Definitivo	1. Confirmación neuropatológica de sCJD. 2. Confirmación de la presencia de PrP ^{Sc} mediante inmunocitoquímica o Western Blot. 3. Presencia de fibrillas asociadas a <i>scrapie</i> .	Al menos una.
-------------------	---	---------------

Criterios propuestos por el consorcio MRI-CJD en 2009 [85]

Posible	Al menos dos signos clínicos y duración de la enfermedad de menos de dos años
----------------	---

Probable	Al menos dos signos clínicos y al menos un resultado positivo en pruebas paraclínicas
-----------------	---

Signos clínicos:

1. Demencia.
2. Signos cerebelosos o visuales.
3. Signos piramidales o extrapiramidales.
4. Mutismo acinético.

Exámenes paraclínicos

1. Complejos periódicos de ondas agudas detectadas por electroencefalograma (EEG).
2. Detección de la proteína 14-3-3 en líquido cefalorraquídeo
3. Alto signo de anomalía en caudado y putamen o al menos en dos regiones corticales (temporal-parietal-occipital) por resonancia magnética nuclear, ya sea de difusión (DWI, Diffusion Weighted Imaging) o funcional (FLAIR Fluid Attenuated Inversion Recovery).

Tabla 2: Criterios diagnósticos para vCJD

Criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud en 1999 [83]	
Posible	- Pacientes con los hallazgos de (I) y al menos 4 hallazgos de (II) y EEG sin la apariencia típica de sCJD.
Probable	- Pacientes con los hallazgos de (I) y al menos 4 hallazgos de (II), hiperintensidad bilateral de los núcleos pulvinares en imagen de resonancia magnética (MRI) y EEG sin la apariencia típica de sCJD (complejos periódicos trifásicos generalizados de aproximadamente 1 Hz). - Pacientes con los hallazgos de (I) y biopsia amigdalар positiva (la biopsia amigdalар no se recomienda como práctica de rutina ni en casos en los que el EEG sugiere sCJD, pero ayuda en casos en los que las observaciones clínicas sugieren vCJD pero no se observa la hiperintensidad bilateral).
Definitivo	- Pacientes con los hallazgos de (I) y confirmación neuropatológica de vCJD.
Hallazgos:	
(I)	
- Desorden psiquiátrico progresivo.	
- Duración de la enfermedad mayor a 6 meses.	
- Carencia de diagnóstico alternativo.	
- Sin historial de exposición iatrogénica a TSEs.	
- Sin evidencias de formas familiares de TSE.	
(II)	
- Síntomas psiquiátricos tempranos (depresión, ansiedad, apatía, delirio).	
- Dolor o disestesia persistentes.	
- Ataxia.	
- Corea, distonía o mioclonías.	
- Demencia.	

Uno de los biomarcadores utilizados en el diagnóstico de enfermedades priónicas es la presencia de proteínas 14-3-3 en líquido cefalorraquídeo (LCR) [86]. Estas proteínas están altamente conservadas y están presentes en todos los organismos eucarióticos conocidos [87]. Sus niveles más altos de expresión en humanos se encuentran en las neuronas, específicamente en la sinapsis, y se libera al LCR como consecuencia de una destrucción rápida y extensa del tejido cerebral, como en el caso de las TSEs [88]. La detección de estas proteínas se lleva a cabo mediante ensayo ELISA o Western-Blot y niveles elevados tienen valores altos de sensibilidad (95%) y especificidad (93%) para CJD. Sin embargo, otras condiciones pueden provocar la liberación de proteínas 14-3-3 a LCR, como son encefalitis virales, hemorragias o infartos cerebrales recientes y otras que cumplan con la destrucción rápida y extensa de tejido cerebral [84]. También se ha encontrado 14-3-3 en LCR de algunos pacientes con enfermedad de Alzheimer [89].

Otra prueba que da información para el diagnóstico de TSEs es el electroencefalograma (EEG), que además del diagnóstico también da información sobre el progreso de la enfermedad [84]. El EEG típico de un paciente de sCJD muestra complejos de ondas agudas periódicas, que consisten en ondas agudas bifásicas o trifásicas acompañadas por poli-puntas y ondas más lentas con duración entre 100 y 600 ms, que se repiten cada 0.5 - 2.0 segundos [90, 91]. Estos complejos no se observan en EEG de pacientes de vCJD, por lo cual es uno de los criterios diferenciales entre ambas variantes [83].

3.6.6 Terapia

Actualmente no existen tratamientos capaces de detener el progreso o revertir los efectos de las enfermedades priónicas [1]. Diversas sustancias han sido probadas obteniéndose efectos variados entre los que destaca, por ejemplo, la anfotericina B, que podría prolongar el tiempo de incubación de los priones en modelos animales e *in vitro*, aunque su toxicidad en dosis altas es una limitante en el tratamiento [1, 92, 93]. Por otro lado, el polisulfato de pentosán (un coagulante y antiinflamatorio usado en veterinaria) fue administrado intracerebralmente a un paciente con vCJD y, aunque el beneficio clínico no fue claro, al parecer se alargó el curso de la enfermedad [94].

El tratamiento de pacientes con TSEs se concentra en controlar los síntomas y puede incluir agentes antiepilépticos como fenitoína o carbamazepina para el control de

convulsiones, benzodiazepinas como el clonazepam para el control de mioclonías y antipsicóticos como la quetiapina para el manejo de los síntomas psiquiátricos [1].

3.7 Enfermedades causadas por priones en animales

Diversas especies animales también son afectadas por enfermedades priónicas (Tabla 3).

Tabla 3: Enfermedades priónicas en animales [95]

Enfermedad	Especies afectadas	Etiología	Año de la descripción
Scrapie	- Ovejas - Cabras	Infección con priones de origen desconocido	1732
Encefalopatía transmisible del mink (TME)	- Mink	Infección con priones de <i>scrapie</i>	1947
Enfermedad del desgaste crónico (CWD)	- Ciervo - Alce	Infección con priones de origen desconocido	1967
Encefalopatía espongiforme bovina (BSE) “Enfermedad de las vacas locas”	- Bovinos	Infección con priones de origen desconocido	1986
Encefalopatía espongiforme de los ungulados exóticos (EUE)	- Antílopes (Nyala, Kudu)	Infección con priones de BSE	1986
Encefalopatía espongiforme felina (FSE)	- Felinos	Infección con priones de BSE	1990
TSE en primates no-humanos (NHP)	- Lémures	Infección con priones de BSE	1996

Es importante mencionar que las últimas tres (EUE, FSE y NHP) surgieron a partir de alimento contaminado con priones de BSE y son ejemplos de la transmisibilidad de estas enfermedades entre distintas especies. La importancia económica de algunas de estas especies, así como el riesgo de transmisión por el consumo de derivados de éstas, justifican la importancia del estudio de las enfermedades priónicas en animales.

3.8 Mutaciones en el gen *PRNP*

Hasta el momento se han reportado al menos 30 mutaciones de las que se sabe que causan enfermedades priónicas [2]. La relación entre algunas de estas mutaciones y las diferentes enfermedades priónicas está bien definida (Fig. 17) [39].

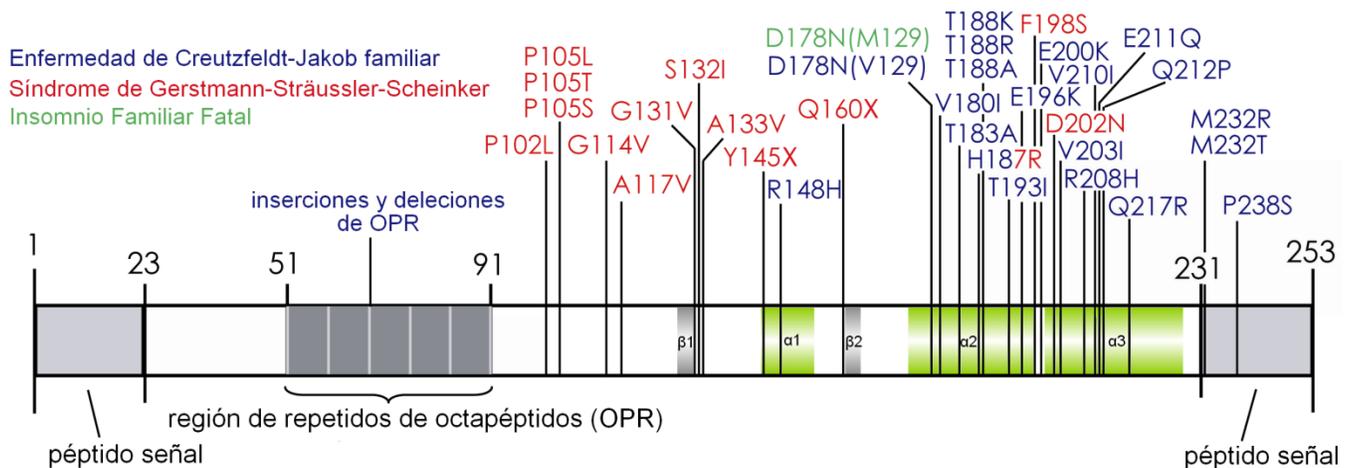


Figura 17: Mutaciones en el gen *PRNP* asociadas a TSEs. Mutaciones patogénicas del gen *PRNP* y su relación con las diferentes enfermedades priónicas, señaladas por colores [Modificada de 2, 39]

Inserciones de dos o más repeticiones de octapéptidos (OPR) están relacionadas con enfermedades priónicas. Inserciones cortas (2 a 6 repetidos extra) generan un fenotipo de CJD mientras que inserciones más largas (8 o 9 repetidos extra) causan la patología de GSS [1]. Por otro lado, se han reportado dos casos de pacientes de CJD que presentaron la deleción de 2 repeticiones de octapéptidos (2-OPRD) [96, 97] y la ausencia de este genotipo en población sana sugiere la relación entre la deleción y la enfermedad [2].

Cuatro residuos de la región no estructurada N-terminal presentan mutaciones relacionadas con GSS. Éstas son P102L, P105L/S/T, G114V y A117V [39]. Es probable que esta región esté involucrada en la conversión entre PrP^C y PrP^{Sc}, sin embargo no se cuenta con suficiente evidencia sobre el efecto que tienen estas mutaciones en la estructura globular de la proteína o su conversión a PrP^{Sc} [98]. Se ha encontrado que las mutaciones P105L y A117V resultan en un ligero aumento en la generación de la forma transmembranal CtmPrP [99].

Dos mutaciones de paro prematuro (Y145X, Q160X) producen formas truncadas de PrP. Watzlawik *et al.* [100] demostraron que la forma truncada más larga (residuos 23 a 159), que contiene parte de la hélice α 1 se agrega mucho más rápido que el fragmento 23-144. La ausencia del dominio globular en la mutante Y145X limita la importación de PrP al retículo endoplásmico, por lo que no se completa el procesamiento post-traducciona l y la proteína es degradada rápidamente por acción del proteasoma [43, 101, 102].

La mutación E200K es la causa más frecuente de enfermedades priónicas hereditarias [2] y se encuentra clasificada dentro de las mutaciones que afectan la interacción de puentes salinos del dominio globular, junto con R148H, D178N, E196K, R208H y E211Q. Dichas interacciones están involucradas en la estabilización de la estructura terciaria de PrP [39].

Dentro de esta misma clasificación encontramos la mutación D178N, que puede causar fCJD o FFI dependiendo del alelo del codón 129 al que esté asociada [103].

Las mutaciones en residuos polares no interfieren con las interacciones de puente salino, pero sí afectan otros tipos de interacciones que estabilizan la estructura terciaria de la proteína. La mutación T183A causa una glucosilación anormal que afecta el plegamiento y la unión de GPI, además de que se pierde un enlace de puente de hidrógeno que ancla la lámina β 2 a la hélice α 1 [39, 104, 105]. Con la mutación H187R también se pierde un puente de hidrógeno que, en este caso, ancla las hélices α 1 y α 2. En el residuo adyacente (T188) también puede haber mutación, que puede ser por arginina, lisina o alanina, causando fCJD. Por otro lado, las mutaciones D202N, Q212P y Q217R ocurren en residuos que estabilizan la hélice α 3. Las mutantes Q217R carecen del anclaje GPI [39]

Otro grupo de mutaciones afecta residuos hidrofóbicos del dominio globular. Se han realizado simulaciones en las que se observa que la mutación G131V puede causar la

extensión de las láminas β sin que esto tenga un efecto en la estabilidad global de la proteína [106]. Las mutaciones V180I, F198S y V210I pueden causar defectos en la glucosilación, unión de GPI y plegamiento, de manera similar a la mutación T183A [105, 107, 108, 109]. Adicionalmente, la mutación F198S produce un espacio en el centro hidrofóbico de PrP, afectando la estabilidad de la proteína [39, 110, 111].

Por último, también se han reportado tres mutaciones patogénicas en la región del péptido señal C-terminal, todas asociadas con fCJD: M232R/T y P238S. El mecanismo de citotoxicidad de estas tres mutantes no se conoce y recientemente se demostró que las mutaciones en el codón 232 no interfieren con la unión de GPI pero causan que PrP se una a la membrana en una orientación alternativa (C-transmembranal) [112].

Un estudio del grupo de trabajo encontró las mutaciones E200K y T188R, causantes de fCJD, en pacientes mexicanos con demencia de rápida evolución, encontrándose la primera en seis y la segunda en tres pacientes [113].

3.9 Polimorfismos en el gen *PRNP*

Adicionales a las mutaciones patogénicas, se han reportado alrededor de 20 variantes que no están directamente ligadas a enfermedades priónicas ya que se encuentran tanto en pacientes como en población sana (Fig. 18). Estos polimorfismos pueden modular las enfermedades priónicas con efectos variables de acuerdo a la población [114].

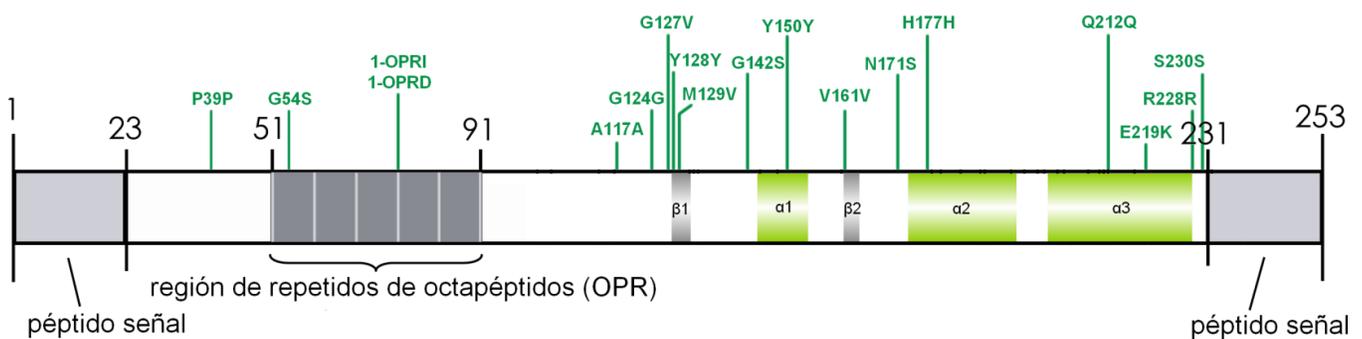


Figura 18: Polimorfismos en el gen *PRNP*. Diagrama del gen *PRNP* señalando los polimorfismos sinónimos y no-sinónimos reportados [Modificada de 2, 39]

Sin duda, el más relevante y el más estudiado de estos polimorfismos es el del codón 129 en el que un cambio de adenina por guanina en la posición 385 (M129V; c.385 A>G) genera un cambio de aminoácido de metionina por valina [73]. Las frecuencias de este polimorfismo han sido evaluadas en población sana de distintos países, encontrándose, en general, frecuencias entre 40 y 50% de individuos con los genotipos 129M/M y 129M/V [114]. Una excepción es el caso de Japón, donde hay un 92% de individuos 129M/M, 8% 129M/V y 0% 129V/V. La información de los genotipos en este polimorfismo en diversas poblaciones sugiere un incremento en la frecuencia del genotipo 129M/M de oeste a este, reflejando las migraciones humanas [115].

Como se ha comentado anteriormente en este trabajo, el polimorfismo M129V influye en el fenotipo de enfermedades priónicas hereditarias. Concretamente en la mutación D178N que causa FFI al estar acoplada al alelo 129M o fCJD si la asociación es con el alelo 129V [39]. Sin embargo, la gran importancia de este polimorfismo se debe a que se ha observado que puede afectar la susceptibilidad a enfermedades priónicas, el tiempo de incubación de las formas adquiridas y el fenotipo clínico y patológico de las TSEs [103, 116, 117, 118]. Resulta interesante que mientras que aproximadamente el 40% de la población mundial tiene el genotipo 129M/M, alrededor del 70% de los pacientes con sCJD y todos los casos confirmados de vCJD tienen este genotipo. Estos hallazgos sugieren que el genotipo 129M/M es un factor de riesgo para estas enfermedades [114]. Sin embargo, se cree que aunque los genotipos 129M/V y 129V/V solamente retrasan la aparición de la enfermedad y que, eventualmente, aparecerán casos de vCJD en individuos con estos genotipos [119].

Otro argumento que sugiere la característica protectora del alelo 129V es que su frecuencia más alta se encuentra Papúa Nueva Guinea, sitio donde la reciente epidemia de *kuru* ejerció una fuerte presión selectiva [120]. Otros reportes han encontrado alta frecuencia de este alelo en población nativa de centro y Sudamérica [121, 122, 123]. Se piensa que esto puede tener tres causas: efecto fundador y cuellos de botella poblacionales, deriva génica en las poblaciones americanas tempranas, presión selectiva por epidemias parecidas al *kuru* (existe evidencia de que estas poblaciones practicaban el canibalismo). No es posible determinar la causa exacta y, al no ser mutuamente excluyentes, podría tratarse de una combinación de las tres [120].

Probablemente como consecuencia de la epidemia de *kuru*, se ha identificado el polimorfismo G127V en población del área expuesta a esta enfermedad. No se ha

reportado ningún caso de *kuru* con el alelo 127V por lo que se cree que también es protector frente a infecciones por priones [12].

Otro polimorfismo que también tiene efecto en la susceptibilidad a contraer enfermedades priónicas es el cambio entre glutamina y lisina en el codón 219 (E219K; c.655 G>A) [73]. Este polimorfismo sólo se ha encontrado en poblaciones de Asia y el Pacífico (donde la frecuencia del alelo 129M es mayor) y no se ha detectado en ningún caso de sCJD [73, 112]. Sin embargo, sí se ha encontrado en casos de vCJD, lo cual sugiere factores de riesgo adicionales [114, 124].

El segundo polimorfismo más frecuente en población caucásica es el polimorfismo silencioso A117A (GCA > GCG), encontrado en aproximadamente 5% de la población. No se han encontrado diferencias en la frecuencia de este polimorfismo entre pacientes con enfermedades priónicas y población sana, sin embargo, se ha sugerido que, al estar ligado al alelo 129V, no se encuentra en pacientes con vCJD [114]. En este mismo codón se ha descrito la mutación A117V, asociada a GSS, y se piensa que ésta surgió a partir de la sustitución silenciosa [125].

La deleción de 24 pares de bases en la región de octapéptidos repetidos (OPR) resulta en la pérdida de 8 aminoácidos en esa región (1 repetición) por lo que se le denomina 1-OPRD. No se le ha relacionado con enfermedades priónicas y se considera que ocurre en cerca del 3% de la población sana [1]. Un estudio en líneas celulares de cáncer gástrico y pacientes chinos con esta enfermedad encontró una alta frecuencia de este polimorfismo [126].

4. Planteamiento del problema

Se ha demostrado que algunos polimorfismos presentes en la región codificante del gen *PRNP* están involucrados en la susceptibilidad a enfermedades priónicas así como en la velocidad de progresión y manifestaciones clínicas de éstas. El conocimiento de las frecuencias de los polimorfismos de protección o susceptibilidad en una población, es útil para estimar el riesgo de esa población a padecer grandes epidemias de enfermedades priónicas. Sin embargo, no se cuenta con información sobre la frecuencia de estos polimorfismos en población mexicana.

Existen estudios que analizan los polimorfismos presentes en *PRNP* en poblaciones nativas de centro y Sudamérica, en las cuales destaca la alta frecuencia del alelo 129V [121, 122, 123]. Sin embargo, un estudio previo del grupo de trabajo reportó la frecuencia del polimorfismo M129V en 100 muestras de individuos sanos mestizos mexicanos, encontrando una frecuencia de 0.625 para el alelo metionina [127].

Consideramos necesario hacer un estudio más amplio y completo para identificar los polimorfismos presentes en el gen *PRNP* en población sana mestiza mexicana, la más representativa del país, y evaluar la frecuencia de éstos, analizando un mayor número de muestras que el estudio anterior.

4.1 Hipótesis

Dado el componente europeo del mestizaje en nuestro país y ya que los casos reportados de TSEs corresponden a las formas familiares, sin haberse registrado grandes epidemias que ejercieran una presión selectiva basada en estas enfermedades, no se espera encontrar polimorfismos protectores (E219K) o predominancia del alelo 129V, características de poblaciones expuestas a grandes epidemias de enfermedades priónicas, como el *kuru* en la población Fore de Nueva Guinea.

4.2 Objetivos

Identificar los polimorfismos presentes en la región codificante del gen *PRNP* en controles sanos mestizos mexicanos y determinar la frecuencia con la que éstos se presentan.

5. Diseño experimental

A continuación se presenta un diagrama resumido de la metodología seguida. Cada uno de los pasos será detallado más adelante.

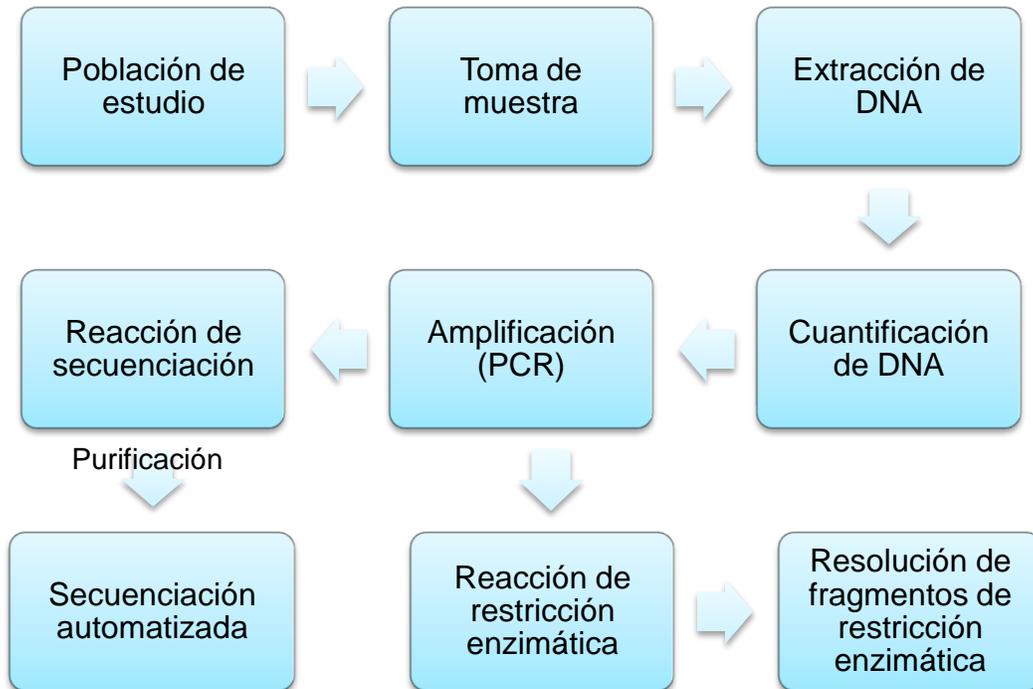


Figura 19: Metodología general

5.1 Población de estudio

Se realizó el análisis de 338 muestras de DNA correspondientes a individuos controles sanos mestizos mexicanos, sin antecedentes familiares de enfermedades neurodegenerativas ni demencias de rápida evolución. Todos firmaron carta de consentimiento informado. La distribución por género fue de 167 mujeres y 171 hombres, con edades entre los 18 y 79 años y una edad mediana de 24 años.

- Criterios de inclusión:
 - Que el individuo sea sano y no tenga antecedentes familiares de enfermedades neurodegenerativas ni demencias de rápida evolución.
 - Que el individuo sea mexicano y que al menos tres de sus abuelos también lo sean, pudiendo tener uno de origen español.

- Criterios de exclusión:
Que el individuo no sea mexicano o que más de uno de sus abuelos no lo fueran.
Que el individuo padezca o tenga algún familiar que padeciera enfermedades neurodegenerativas o demencias de rápida evolución
Que el individuo no aceptara participar en el estudio.

5.2 Toma de muestra

Se obtuvieron 6 mL de sangre periférica de los individuos mediante venopunción en tubos *Vacutainer* con polianetol sulfato de sodio, citrato de sodio y dextrosa como aditivos anticoagulantes. Las muestras fueron preservadas a 4°C hasta el momento de su uso.

5.3 Extracción de DNA por el método de sales-cloroformo

1. Se transfirieron 3 mL de sangre a un tubo Falcon de 15 mL, se agregaron 9 mL de amortiguador de lisis de glóbulos rojos (BLGR) y se homogenizó por inversión.
2. Se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 6 minutos a 4°C. Se decantó, conservando el botón.
3. Se resuspendió el botón en 1 mL de BLGR y se transfirió a dos tubos de reacción de 1.5 mL.
4. Se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 2 minutos y se decantó. Este procedimiento se repitió un máximo de cuatro veces hasta obtenerse un botón blanco, aparentemente libre de glóbulos rojos.
5. Se agregó al botón 570 µL de NaCl [5 mM], 40 µL de SDS [10%] y 200 µL de solución saturada de NaCl [7M], homogenizando entre cada uno.
6. Se centrifugó a 11500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de reacción de 1.5 mL.
7. Se agregó 700 µL de mezcla Cloroformo:Alcohol Isoamílico (proporción 49:1) y se homogenizó.
8. Se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo de reacción de 1.5 mL.
9. Se añadió 900 µL de etanol absoluto frío y se homogenizó.
10. Se centrifugó a 13500 r.p.m. durante 15 minutos para descartar el sobrenadante.

11. Se agregó al botón 700 μL de etanol al 70% frío y se agitó.
12. Se centrifugó a 13500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. El botón resultante fue secado en un concentrador al vacío durante aproximadamente 30 minutos, a temperatura ambiente.
13. El botón seco se disolvió en 200 μL de agua estéril y se mantuvo a 60°C durante 2 horas para disolver completamente y homogenizar.

Este método se basa en eliminar los glóbulos rojos, carentes de material genético nuclear, para posteriormente lisar las células blancas, que sí lo tienen. Posteriormente se eliminan impurezas como proteínas y restos celulares y se precipita el DNA por su característica insolubilidad en alcoholes.

5.4 Cuantificación de DNA

Se cuantificó la concentración de DNA de las muestras mediante espectrofotometría en equipo *NanoDrop 2000*. La concentración fue dada por la absorbancia a 260 nm. Por su parte, la pureza de las muestras fue determinada por la relación A_{260}/A_{280} . Los cálculos fueron realizados automáticamente por el software acoplado al equipo. Esta determinación se basa en que las bases nitrogenadas del DNA tienen un máximo de absorción en 260 nm y aminoácidos aromáticos como el triptófano y la tirosina absorben radiación a 280 nm.

Para la determinación se ajustó el blanco con agua y se eligió el programa de cuantificación de DNA de doble cadena. Para cada cuantificación se utilizó un volumen de 1.5 μL de la muestra, previamente homogenizada mediante agitación a 40°C y 850 r.p.m. en equipo *Thermomixer*.

5.5 Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación del exón 2 del gen *PRNP* utilizando los oligonucleótidos descritos por Furukawa *et al* [128] y cuya secuencia se encuentra en los anexos del final del trabajo.

Tabla 4: Reactivos utilizados para la PCR

Reactivo	Concentración	Volumen
Oligonucleótido sentido	10 μ M	1 μ L
Oligonucleótido reverso	10 μ M	1 μ L
Master Mix		10 μ L
Agua		16 μ L
DNA genómico	100 ng/ μ L	2 μ L
Volumen final de reacción		30 μL

Las condiciones de reacción utilizadas fueron previamente estandarizadas y se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 5: Condiciones de la PCR

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	10 min
Desnaturalización	94 °C	1 min
Hibridación	56 °C	1 min
Extensión	72 °C	2 min
Extensión final	72 °C	5 min
Conservación	4 °C	∞

} 25 ciclos

5.6 Resolución de productos de PCR

Para confirmar que los productos de PCR eran los esperados y estimar la concentración del producto obtenido, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

- Preparación del gel:
 1. Se pesó 2 g de agarosa ultra pura por cada 100 mL de amortiguador Tris-Boratos-EDTA (TBE) 1X.
 2. Se calentó la mezcla hasta conseguir la homogenización de la solución.
 3. Se agregó 1 μ L de bromuro de etidio [10 mg/mL] por cada 100 mL de amortiguador TBE 1X y se homogenizó por agitación.
 4. Se vertió la mezcla en el porta-gel, insertando los peines que formarían los pozos para cargar las muestras.

5. El gel se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta su solidificación.
- Electroforesis:
 1. Se realizó aplicando un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 60 minutos.
 2. El gel fue analizado en un fotodocumentador de luz UV Bio-Rad Gel Doc XR+. Una fotografía del gel fue almacenada para su posterior referencia.

5.7 Amplificación de productos con variantes de número de copia

A los productos de PCR de las muestras en las que se observaron dos bandas, posiblemente indicadoras de variantes de número de copia, se repitió la amplificación, utilizando en este caso un nuevo oligonucleótido reverso, con el que se obtenía un producto de 452 pb. El resto de los reactivos utilizados, así como las condiciones de reacción, fueron los mismos que para la primera PCR.

El cambio de oligonucleótido para la obtención de un producto más corto facilitaría la separación mediante electroforesis de las dos bandas y el análisis más enfocado en la región de octapéptidos repetidos.

5.8 Resolución y purificación de dobles bandas

Las dos bandas observadas en los productos de la repetición de PCR fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%. La electroforesis se llevó a cabo durante 20 horas a 80 V.

El amplicón de cada una de las bandas fue purificado a partir del gel utilizando el estuche comercial QIAquick (QIAGEN), de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante. Este método se basa en la disolución de la agarosa para la liberación del amplicón y posteriormente la purificación de éste mediante el uso de soluciones alcoholadas en una columna.

5.9 Reacción de secuenciación.

51 muestras, correspondientes a 26 hombres y 25 mujeres con edades entre 40 y 79 años y una edad promedio de 53 años, fueron seleccionadas para la secuenciación del exón 2 del gen *PRNP*. Para la secuenciación se utilizó el estuche comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). En las siguientes tablas se detallan los reactivos utilizados, así como las condiciones de reacción.

Tabla 6: Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación

Reactivo	Concentración	Volumen
Oligonucleótido reverso	10 μ M	1 μ L
Amortiguador		3.5 μ L
Big Dye		1 μ L
Agua		11.5-13.5 μ L
Producto de PCR		1-3 μ L
Volumen final de reacción		20 μL

Tabla 7: Condiciones de la reacción de secuenciación

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96 °C	30 s
Desnaturalización	95 °C	30 s
Hibridación	50 °C	10 s
Extensión	60 °C	4 min
Extensión final	72 °C	1 min
Conservación	4 °C	∞

} 25 ciclos

El mismo procedimiento de secuenciación se realizó para ambas bandas en los casos de variantes de número de copia.

5.10 Purificación de los productos de la reacción de secuenciación

La purificación de los productos de la reacción de secuenciación se llevó a cabo en columnas de purificación Centri-Sep (Princeton Separations), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante:

- Preparación de las columnas:
 1. Se agregó 800 μ L de agua y se agitó para hidratar la resina. Las columnas se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
 2. Después de retirar la tapa inferior de las columnas e introducirlas en tubos colectores se centrifugaron a 3000 r.p.m durante un minuto. El líquido recolectado fue desechado.
 3. Se repitió el procedimiento anterior, esta vez retirando también la tapa superior de las columnas.
- Purificación:
 1. Se aplicó el producto de la reacción de secuenciación en el centro de la columna, cuidadosamente para no tocar el gel formado ni las orillas de la columna.
 2. Se centrifugó a 3000 r.p.m. durante dos minutos, colocando la columna en un tubo colector de 1.5 mL.
 3. El producto filtrado fue secado en un concentrador al vacío, a temperatura ambiente.

5.11 Secuenciación automatizada

El producto purificado fue resuspendido en 15 μ L de formamida ultrapura y transferido a una placa de 96 pozos para ser desnaturalizado a 94°C durante 5 minutos y analizado en el secuenciador ABI PRISM 3130. La reacción de secuenciación y el análisis automatizado se basan en el método de Sanger.

5.12 Análisis de secuencias para detección de polimorfismos

Las secuencias fueron analizadas mediante el software Sequencing Analysis v.5.3. Los polimorfismos identificados en las muestras secuenciadas permitieron establecer el análisis mediante RFLP con las enzimas *PvuII* y *XceI*, que se utilizaría en el resto de las muestras analizadas.

5.13 Reacción de restricción enzimática

Para la identificación del polimorfismo A117A se utilizó la enzima Fast Digest *PvuII* (Fermentas). Los reactivos utilizados y el procedimiento se presentan a continuación:

Tabla 8: Reactivos utilizados en la restricción con *PvuII*

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	10 µL
Agua	17 µL
Amortiguador Fast Digest	2 µL
Fast Digest <i>PvuII</i>	1 µL
Volumen final de reacción	30 µL

Se agregaron todos los reactivos en un tubo de reacción de 600 µL. Se agitó suavemente y se dejó incubar a 37°C durante 30 minutos a 300 r.p.m.

De manera independiente, para la identificación del polimorfismo M129V se realizó la digestión utilizando la enzima *XceI* (Fermentas).

Tabla 9: Reactivos utilizados en la restricción con *XceI*

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	15 µL
Agua	13 µL
Amortiguador Tango	2 µL
<i>XceI</i>	0.2 µL
Volumen final de reacción	30.2 µL

Los reactivos se depositaron en un tubo de reacción de 600 µL. Se agitó suavemente y se dejó incubar a 37°C durante 16 horas a 300 r.p.m.

5.14 Resolución de los productos de restricción enzimática

Los productos de la restricción con *PvuII* fueron resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. Para esto se siguió un procedimiento similar al seguido para la resolución de los productos de PCR, pesando 2.5 g de agarosa ultrapura por cada 100 mL del amortiguador TBE 1X.

Los productos de la restricción con *XceI* fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% según el procedimiento detallado a continuación.

Tabla 10: Reactivos utilizados para la preparación del gel de poliacrilamida al 6%

Reactivo	Concentración inicial	Volumen
Acrilamida-Bisacrilamida	40%	8.5 μ L
Amortiguador TBE	10 X	5.0 μ L
Agua estéril		36.5 μ L
Volumen final de reacción		50 μL

- Preparación del gel:
 1. Se mezclaron todos los reactivos en un vaso de precipitados utilizando un agitador magnético.
 2. Se agregaron 700 μ L de persulfato de amonio y 50 μ L de Tetrametiletilendiamina (TEMED) y se homogenizó mediante agitación rápida con el agitador magnético. El persulfato de amonio lleva a cabo la reacción de polimerización entre la acrilamida y la Bisacrilamida, funcionando la TEMED como catalizador.
 3. Se depositó la mezcla entre las placas de vidrio y se colocó el peine que formaría los pozos para cargar las muestras.
 4. El gel se dejó polimerizar a temperatura ambiente.
- Electroforesis:
 1. Los vidrios con el gel se montaron en la cámara electroforética y se agregó amortiguador TBE 1X hasta las marcas indicadas. Se retiró el peine del gel.
 2. Se agrega a cada tubo de reacción de restricción 5 μ L de amortiguador de carga y se homogenizó mediante agitación.

3. Cada mezcla fue depositada dentro de un pozo del gel y en ambos extremos de éste se depositó 1 μL de diferentes marcadores de peso molecular, añadiendo previamente el amortiguador de carga. Otro pozo se cargó con producto de PCR sin digerir.
4. Se aplicó un voltaje constante de 220 V durante aproximadamente 60 minutos.
5. El gel fue teñido mediante inmersión en solución de bromuro de etidio.
6. El gel fue analizado en un fotodocumentador de luz UV Bio-Rad Gel Doc XR+. Una fotografía del gel fue almacenada para su posterior referencia.

6. Resultados y discusión

Se analizaron un total de 338 muestras (167 mujeres, 171 hombres) con edades entre 18 y 79 años y una edad mediana de 24 años.

La reacción de PCR permitió la amplificación de un fragmento de 738 pb correspondiente a casi la totalidad de los nucleótidos presentes en la región codificante del exón 2 del gen *PRNP*.

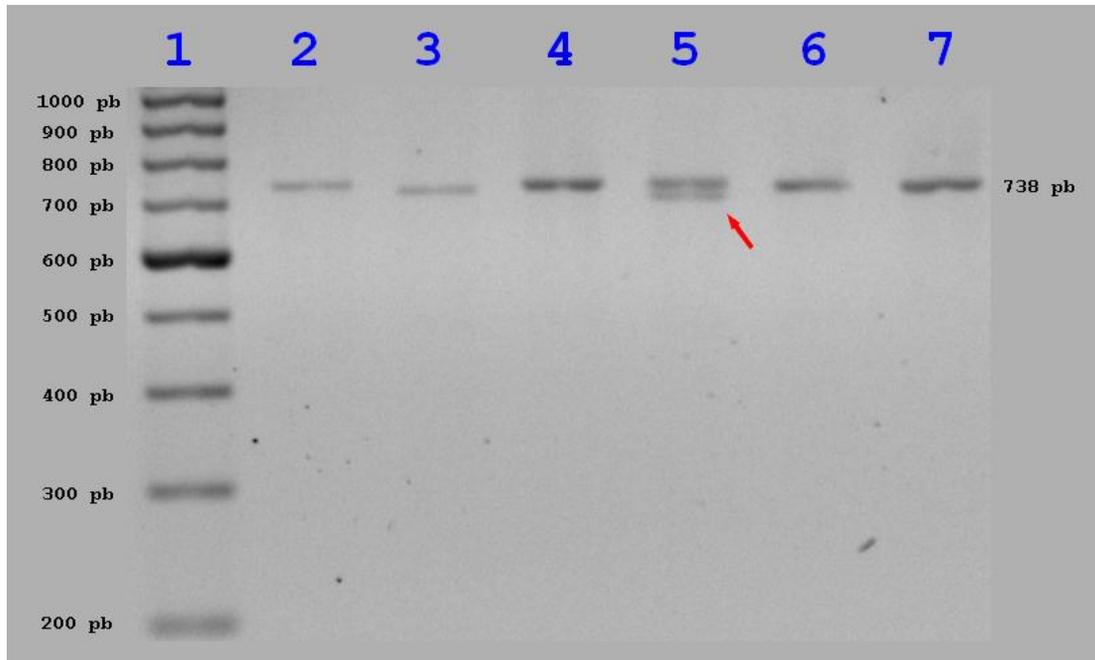


Figura 20: Resolución de los productos de PCR. Gel de agarosa al 2%. 100 V, 60 min.
En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 100 bp ladder (Invitrogen).

En la imagen se observa que se logró la obtención del amplicón esperado y, al no observarse otras bandas, se asegura que la amplificación fue específica del exón 2 de *PRNP*. Es importante notar la banda del carril 5, señalada con una flecha. En 11 de las 338 muestras analizadas se observó la aparición de dos bandas, lo cual puede indicar una variante de número de copias en la región de repetidos. Estas muestras fueron sometidas a un procedimiento adicional para conocer la naturaleza de esta variante.

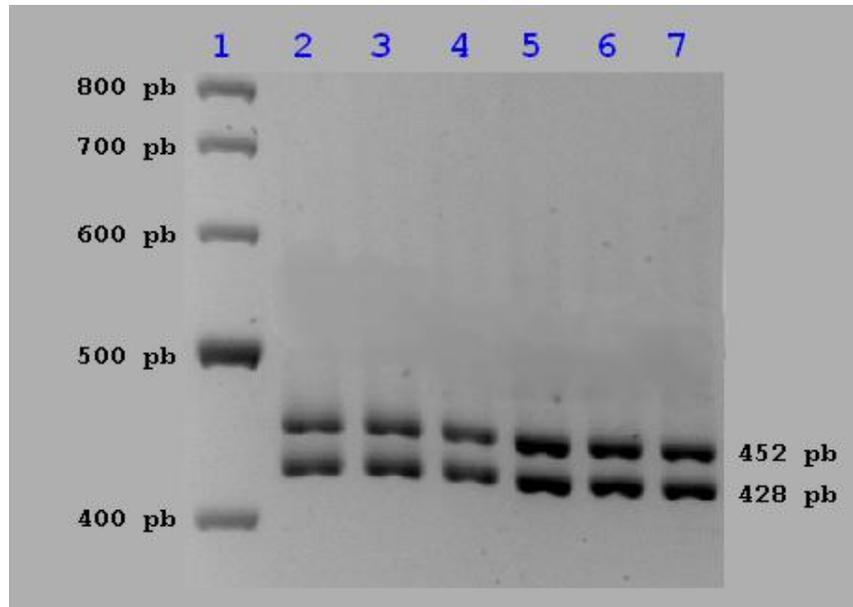


Figura 21: Resolución de bandas dobles. Gel de agarosa al 4%. Resuelto a 80 V, durante 20 h. En el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega). Las bandas ubicadas entre 400 y 500 pb en los carriles 2-7 corresponden a las variantes de número de copia encontradas, ya que se esperaba un producto de 452 pb.

La secuenciación de cada una de las bandas de las muestras en las que se encontraron dos bandas permitió identificar la delección heterocigota de 24 pares de bases. En 10 de las 11 muestras la delección se encontró entre los nucleótidos 246 y 269 (246_269del Q83_G91), con la cual se pierden parcialmente las secuencias R3 y R4 (DeIR34) de la región de octapéptidos repetidos. En la muestra restante se encontró la delección entre los nucleótidos 204 y 227 (204_227del H69_P76), con la que pierde parcialmente las secuencias R2 y R3 (DeIR23). Esto cumple con lo descrito en [129], donde se concluye que la frecuencia de DeIR34 es mucho mayor que la de DeIR23.

La delección de un octapéptido de la región de repetidos (1-OPRD) está reportada como un polimorfismo no asociado a enfermedades priónicas [130]. Diversas publicaciones han reportado la frecuencia de este polimorfismo en diferentes poblaciones. Un resumen de dichas frecuencias se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Frecuencia del polimorfismo 1-OPRD en diversas poblaciones

Población	Frecuencia alélica 1-OPRD (IC 95%)	Referencia
Europea occidental	0.50% (N/D)	130
Italiana (n=186)	0.54% (0.02-2.07%)	131
Turca (n=100)	1.00% (0.04-3.81%)	132
China Han (n=410)	0.12% (0.00-0.76%)	133
China Hui (n=396)	0.51% (0.15-1.34%)	133
Británica (n=970)	0.67% (0.38-1.16%)	114
Mestiza Mexicana (n=338)	1.63% (0.87-2.93%)	Este estudio

Se observa que la frecuencia alélica de la delección de 24 pares de bases en la región de repetidos de octapéptidos (1-OPRD) encontrada se asemeja a la reportada en otras poblaciones en el mundo. Sólo el trabajo de Bishop, *et al.* [114] detalla la naturaleza de la delección, encontrando 12 individuos con la delección de R3-R4, encontrada mayoritariamente en el presente trabajo, y uno con delección de R2, no encontrada en este trabajo.

La secuenciación permitió encontrar dos variantes. La primera en el codón 117, correspondiente al polimorfismo sinónimo A117A (c.351 A>G). Sólo se encontraron individuos homocigotos GCA y heterocigotos GCA/GCG, sin detectar ningún homocigoto GCG en las 51 muestras secuenciadas.

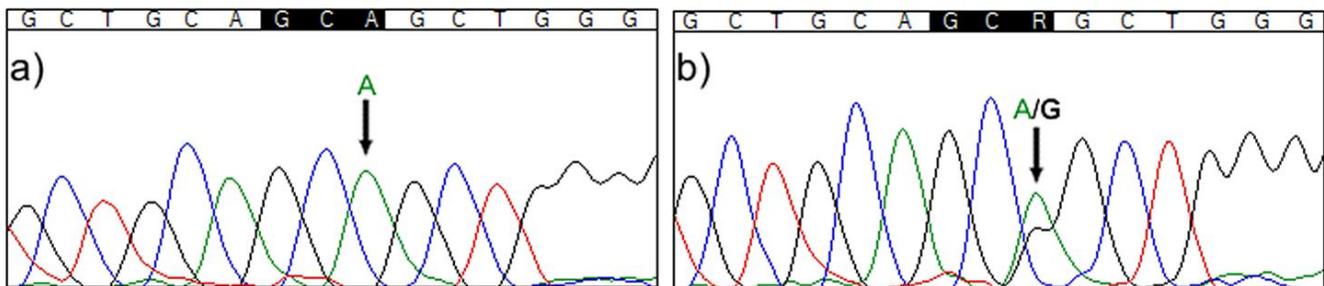


Figura 22: Electroferogramas mostrando los distintos genotipos encontrados en el codón 117 de PRNP. Se presenta la secuencia parcial correspondiente al codón 117 de PRNP. En a) un individuo homocigoto GCA y en b) un individuo heterocigoto GCA/GCG. El cambio de nucleótido se apunta con la flecha.

La segunda variación fue encontrada en el codón 129 y corresponde al polimorfismo M129V (c.385 A>G), ampliamente estudiado en poblaciones alrededor del mundo.

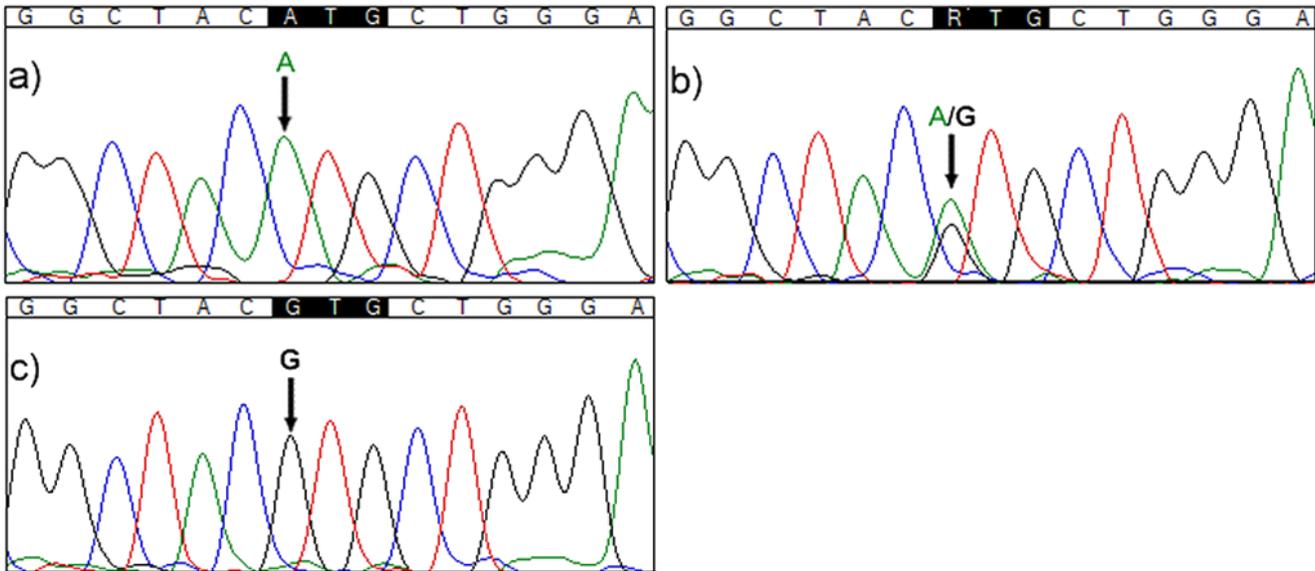


Figura 23: Electroferogramas mostrando los distintos genotipos encontrados en el codón 129 de *PRNP*. Se presenta la secuencia parcial correspondiente al codón 129 de *PRNP*. En a) un individuo homocigoto ATG (Met), en b) un individuo heterocigoto ATG/GTG (Met/Val) y en c) un individuo homocigoto GTG (Val). El cambio de nucleótido se apunta con la flecha.

Con el objetivo de analizar un total de 600 cromosomas para cada una de las dos variantes encontradas, se optó por la técnica de polimorfismos de longitud variable de fragmentos de restricción (RFLP).

Para el estudio del polimorfismo A117A se realizó la digestión del producto de PCR utilizando la enzima de restricción *PvuII*, que reconoce la secuencia palindrómica 5'...C A G▼C T G...3'. Este sitio de restricción está presente en una ocasión en el fragmento amplificado y el corte genera dos fragmentos, de 332 pb y 406 pb, respectivamente. El sitio de restricción se pierde al modificarse adenina por guanina en la posición 351, encontrándose en ese caso una sola banda correspondiente a los 738 pb del producto sin digerir.

Este sitio de restricción también se pierde con la mutación A117V (c.350 C>T), asociada con GSS, por lo que las 12 muestras encontradas por el análisis RFLP fueron confirmadas mediante secuenciación para descartar esta posibilidad.

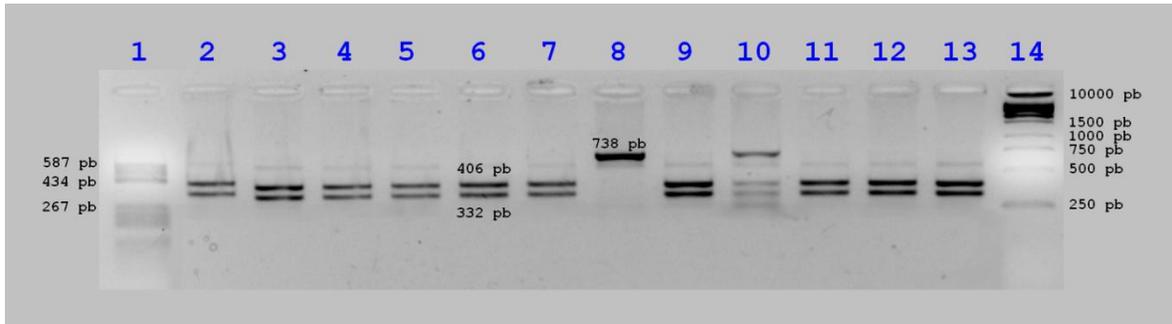


Figura 24: Resolución de productos de restricción con *PvuII*. Gel de agarosa al 2.5%. 100 V, 90 min. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular V (Roche) y el carril 14 contiene el marcador 1 kb DNA ladder (Promega). En el carril 8 se cargó el producto sin digerir. El carril 10 muestra un individuo heterocigoto GCA/GCG. Los demás carriles muestran individuos homocigotos GCA.

Para el análisis de RFLP del polimorfismo M129V se digirieron los productos de PCR utilizando la enzima de restricción *XceI*, que reconoce la secuencia 5'...R C A T G▼Y...3'. Cabe recordar que R e Y son los códigos de ambigüedad utilizados para denotar purinas y pirimidinas, respectivamente. Este tipo de secuencia está presente en dos ocasiones en el fragmento amplificado, generando tres fragmentos, de 75 pb, 365 pb y 373 pb respectivamente. Uno de estos sitios de restricción coincide con el cambio que codifica el polimorfismo del codón 129 y se pierde con el cambio de adenina por guanina en la posición 385, encontrándose en ese caso fragmentos de 442 pb y 296 pb.

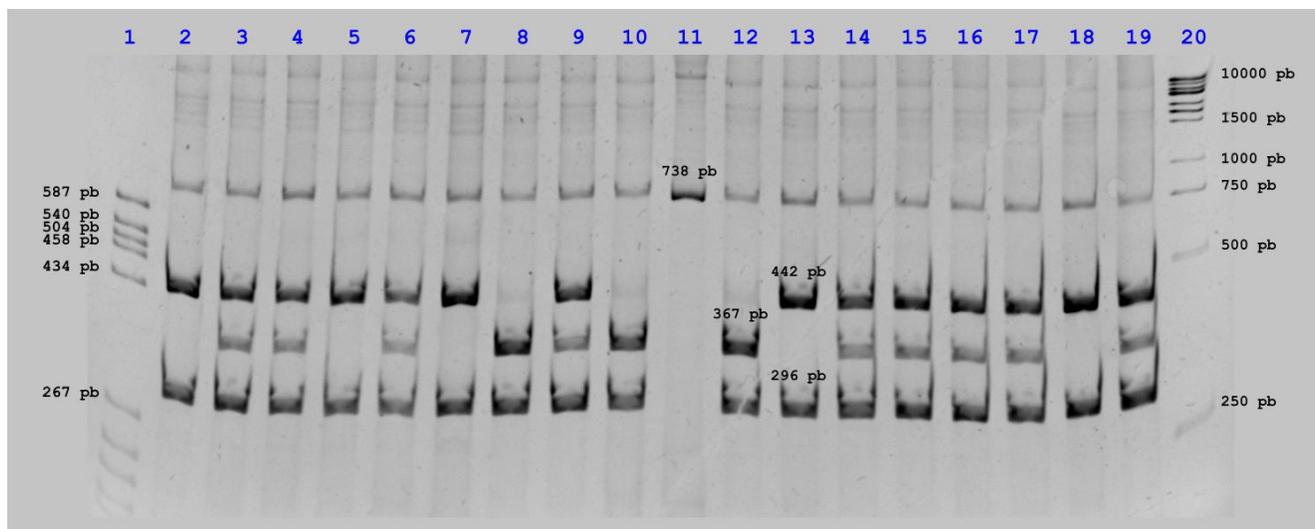


Figura 25: Resolución de productos de restricción con *Xcel*. Gel de poliacrilamida al 6%. 220 V, 60 min. Los carriles 1 y 20 contienen los marcadores de peso molecular V (Roche) y 1 kb DNA ladder (Promega). En el carril 11 se cargó el producto sin digerir. Los carriles 8, 10 y 12 muestran individuos homocigotos ATG (Met). Los carriles 2, 5, 7, 13 y 18 muestran individuos homocigotos GTG (Val). Los carriles 3, 4, 6, 9, 14, 15, 16, 17 y 19 muestran individuos heterocigotos.

La secuenciación y el análisis RFLP permitieron calcular las frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos A117A y M129V en controles mestizos mexicanos.

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs encontrados en el gen *PRNP*

A117A	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
	GCA/GCA	GCA/GCG	GCG/GCG	GCA	GCG
n = 300	0.96	0.04	0.00	0.980	0.020
(IC 95%)	(0.93 - 0.98)	(0.02 - 0.07)	(0.00 - 0.02)	(0.965 - 0.989)	(0.011 - 0.035)
M129V	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
	M/M	M/V	V/V	M	V
n = 300	0.37	0.42	0.20	0.585	0.415
(IC 95%)	(0.32 - 0.43)	(0.37 - 0.48)	(0.16 - 0.25)	(0.545 - 0.624)	(0.376 - 0.455)

Se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos A117A y M129V del gen *PRNP* en controles sanos mestizos mexicanos, acompañadas por el intervalo de confianza al 95%.

Al igual que lo encontrado en la secuenciación, no se encontró ningún individuo homocigoto GCG dentro de las 300 muestras analizadas, entre las cuales se encontró un predominio muy marcado del alelo ancestral GCA (98%). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias alélicas al clasificar las muestras de acuerdo al género. La población cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

A continuación se presentan las frecuencias del alelo 117GCG encontradas en diversas poblaciones.

Tabla 13: Frecuencia del polimorfismo A117A en diversas poblaciones

Población	Frecuencia alélica 117GCG (IC 95%)	Referencia
Caucásica europea (n=120)	10.00% (6.76-14.50%)	134
Británica (n=62)	5.65% (2.56-11.39%)	135
Turca (n=100)	2.50% (0.91-5.88%)	132
Uyghur, este y centro de Asia (n=446)	0.34% (0.07-1.03%)	133
Británica (n=970)	2.89% (2.22-3.74%)	114
Africana, subsahariana (n=110)	4.55% (2.38-8.27%)	123
Asiática (n=431)	1.04% (0.52-2.00%)	123
Europea (n=155)	1.94% (0.79-4.26%)	123
Medio oriente/norte de África (n=170)	3.53% (1.97-6.13%)	123
Oceanía (n=36)	0.00% (0.00-6.07%)	123
Latinoamericana (n=105)	0.00% (0.00-2.16%)	123
Mestiza Mexicana (n=300)	2.00% (1.11-3.50%)	Este estudio

Se observa que la frecuencia de este polimorfismo presenta variaciones en las distintas poblaciones reportadas y que la frecuencia descrita en este estudio se encuentra cerca de la mediana de éstas. Es interesante la comparación con el resultado de Beck *et al.* para Latinoamérica ya que en este grupo, formado por muestras de población nativa de México, Colombia y Brasil, no se encontró ningún alelo con este polimorfismo [123]. Una discrepancia similar con el mismo artículo se encuentra con respecto a las frecuencias del polimorfismo M129V, discutidas a continuación.

Como se mencionó anteriormente, la frecuencia del polimorfismo M129V ha sido estudiada ampliamente en múltiples poblaciones. A continuación se presentan algunos de estos reportes.

Tabla 14: Frecuencia del polimorfismo M129V en diversas poblaciones

Población	Año	M/M	M/V	V/V	Met	Referencia
Británica (n=106)	1991	37.0%	51.0%	12.0%	62.5%	136
Italiana (n=186)	1994	45.0%	40.0%	15.0%	65.0%	131
Francesa (n=161)	1994	39.0%	51.0%	10.0%	64.5%	137, 138
Austriaca (n=300)	1999	43.0%	49.0%	8.0%	67.5%	139
Caucásica (n=398)	1999	39.0%	50.0%	11.0%	64.0%	116
Española (n=268)	2000	42.0%	42.0%	16.0%	63.0%	140
Cretense (n=205)	2001	57.0%	37.6%	5.4%	75.8%	141
Turca (n=100)	2001	57.0%	34.0%	9.0%	74.0%	132
Centro-este asiático (n=59)	2003	88.1%	10.2%	1.7%	93.2%	122
Pacífico (n=16)	2003	68.8%	25.0%	6.2%	81.3%	122
Sur asiático (n=55)	2003	61.8%	34.6%	3.6%	79.1%	122
Europea (n=69)	2003	52.2%	39.1%	8.7%	71.8%	122
Medio oriente (n=24)	2003	45.8%	25.0%	29.2%	58.3%	122
Africana (n=36)	2003	36.1%	38.9%	25.0%	55.6%	122
Latinoamericana (n=49)	2003	6.1%	46.9%	46.9%	29.6%	122
China Han (n=100)	2004	97.6%	2.4%	0.0%	98.8%	133
Británica (n=970)	2009	44.0%	44.4%	11.5%	66.2%	114
Región del <i>kuru</i> (n=480)	2009	16.7%	57.7%	25.6%	45.6%	12
Asiáticos (n=431)	2010	72.0%	26.0%	2.0%	85.0%	123
Oceanía (n=36)	2010	61.0%	31.0%	8.0%	76.5%	123
Europea (n=155)	2010	47.0%	46.0%	7.0%	70.0%	123
Medio Oriente/Norte de África (n=170)	2010	49.0%	39.0%	12.0%	68.5%	123
Africana, subsaharianos (n=110)	2010	36.0%	44.0%	20.0%	58.0%	123
Latinoamericana (n=105)	2010	16.0%	39.0%	45.0%	35.5%	123
Mestiza mexicana (n=100)	2007	37.0%	51.0%	12.0%	62.5%	127
Mestiza mexicana (n=300)	2012	37.3%	42.3%	20.3%	58.5%	Este estudio

Es importante notar que los dos reportes existentes de frecuencias del polimorfismo M129V para población latinoamericana muestran las frecuencias más bajas del alelo 129M, incluso más baja que en la región expuesta a la epidemia de *kuru* [12, 122, 123]. Sin embargo, estos resultados difieren de lo encontrado por el grupo de trabajo, previamente y en el presente estudio, para población mestiza mexicana [127]. Esta diferencia se debe a las poblaciones utilizadas en el análisis, que en los casos de Soldevila, et al. y Beck, et al. se trata de poblaciones nativas de centro y Sudamérica [122]. Beck incluso detalla la inclusión de muestras de origen pima y maya de México, surul y karitiana de Brasil y grupos originarios de Colombia [123]. Como se mencionó en la introducción, es probable que factores como efecto fundador, cuellos de botella, deriva génica y presión selectiva por epidemias parecidas al *kuru* originaran estas frecuencias en las poblaciones originales de Latinoamérica [120], mismas que pudieron modificarse a

causa del mestizaje a partir del siglo XVI, principalmente con europeos, pero también con africanos.

La población no cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual hace esperar que las frecuencias genotípicas y alélicas en este codón cambien. Esto podría explicarse por la convivencia de poblaciones con distintos orígenes a lo largo de la historia de la región, donde se han combinado el componente indígena con el europeo e incluso componente africano.

Bishop *et al.* sugirieron que el polimorfismo del codón 117 está ligado al alelo 129V, por lo cual no aparecería en casos de vCJD [114]. Sin embargo, en el presente trabajo fueron encontrados dos individuos con el haplotipo 117GCA/GCG-129M/M y aunque la frecuencia del alelo 129V sí fue más alta en los individuos con genotipo heterocigoto en el codón 117, la diferencia entre las frecuencias no fue estadísticamente significativa.

La frecuencia de individuos 129M/M y la inexistencia de los polimorfismos protectores E219K y G127V hacen que la población mestiza mexicana sea susceptible a las enfermedades priónicas esporádicas y adquiridas.

7. Conclusiones

- Se analizó la región codificante del gen *PRNP* en 340 individuos sanos mestizos mexicanos y se encontraron en ella 3 polimorfismos: la delección de 24 pares de bases en la región de octapéptidos repetidos (1-OPRD), el polimorfismo sinónimo A117A y polimorfismo de cambio de sentido M129V.
- Las frecuencias de estos polimorfismos fueron 1.62% para 1-OPRD, 2.00% para el alelo 117 GCG y 58.5% para el alelo 129M.
- Las frecuencias de 1-OPRD y A117A encontradas son similares a lo reportado en otras poblaciones, mientras que en el caso de M129V se confirma lo encontrado previamente por el grupo de trabajo donde, a diferencia de reportes de población nativa latinoamericana, predomina el alelo 129M.
- La frecuencia de individuos 129M/M y la inexistencia de los polimorfismos protectores E219K y G127V permite sospechar que la población mestiza mexicana posiblemente sea más susceptible a las enfermedades priónicas esporádicas y adquiridas.
- Éste es el primer reporte de las frecuencias de 1-OPRD y A117A en población mestiza mexicana y el estudio más grande del polimorfismo M129V en dicha población.

8. Perspectivas

- Se sugiere ampliar la comparación determinando las frecuencias de estos y otros polimorfismos en otras poblaciones indígenas mexicanas. Con esto se espera obtener información más amplia y detallada sobre las frecuencias de los polimorfismos en la población nativa americana y poder compararlas con los resultados obtenidos en este trabajo para población mestiza y así evidenciar el efecto del mestizaje en el desequilibrio observado.

9. Bibliografía

1. Brown, K., Mastrianni, J. The Prion Diseases. *Journal of Geriatric Psychiatry And Neurology* (2010). 23(4), 277-298.
2. Lloyd, S., Mead, S., Collinge, J. Genetics of Prion Disease. *Topics in Current Chemistry* (2011). 305, 1-22.
3. Imran, M., Mahmood, S. An Overview of Human Prion Diseases. *Virology Journal* (2011). 8, 599.
4. Van Everbroeck, B., Pals, P., Martin, J., Cras, P. Transmissible Spongiform Encephalopathies: The Story of a Pathogenic Protein. *Peptides* (2002). 23, 1351-1359.
5. Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B., Raab, W. The Early History of the Transmissible Spongiform Encephalopathies Exemplified by Scrapie. *Brain Research Bulletin* (2008). 77, 343-355.
6. Liberski, P. Historical Overview of Prion Diseases: A View From Afar. *Folia Neuropathologica* (2012). 50(1), 1-12.
7. Sarraet, M. Un Cas De Tremblante Sur Un Boeuf. *Revue Médicale Veterinaire* (1883). 7, 312-312.
8. Creutzfeldt, G. Über Eine Eigenartigen Hertförmige Erkrankung Des Zentralnervensystems. *Neurol Psychiatr* (1920). 57, 1-19.
9. Jakob, A. Über Eigenartigen Erkrankung Des Zentralnervensystems Mit Bemerkenswertem Anatomischen Befunde (Spastische Pseudesklerose-Encephalopathie Mit Disseminierten Degenerationsherden). *Neurol Psychiatr* (1921). 64, 147-228.

10. Gerstmann, J., Sträussler, E., Scheinker, I. Über Eine Eigenartige Hereditär-Familiäre Erkrankung Des Zentralnervensystems. Zugleich Ein Beitrag Zur Frage Des Vorzeitigen Lokalen Alterns. *Z Neurol* (1936). 154, 736-762.
11. Polo, J. *Historia Y Clasificación De Las Enfermedades Priónicas Humanas*. (2009). Acceso en Octubre, 2012, Desde <http://www.aulavirtual.senasa.gov.ar/cursos/multimedia/eeb/html/biblio/doc/polo.pdf>
12. Mead, S., Whitfield, J., Poulter, B., Shah, P., Uphill, J., Campbell, T., et al. Collinge, J. A Novel Protective Prion Protein Variant That Colocalizes with Kuru Exposure. *The New England Journal of Medicine* (2009). 361(21), 2056-2065.
13. Cuillé, J., Chelle, P. Experimental Transmission Of Trembling To The Goat. *Comptes Rendus Des Seances De l'Academie Des Sciences* (1939). 208, 1058-1060.
14. Gajdusek, D., Gibbs, C., Alpers, M. Experimental Transmission of a Kuru-Like Syndrome to Chimpanzees. *Nature* (1966). 209(5025), 794-796.
15. Gibbs, C., Amyx, H., Bacote, A., Masters, C., Gajdusek, D. Oral Transmission of Kuru, Creutzfeldt-Jakob Disease and Scrapie to Nonhuman Primates. *Journal of Infectious Diseases* (1980). 140(2), 205-208.
16. Gajdusek, D. Unconventional Viruses and the Origin and Disappearance of Kuru. *Nobel Lecture* (1976). National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.
17. Alper, T., Cramp, W., Haig, D., Clarke, M. Does The Agent of Scrapie Replicate Without Nucleic Acid? *Nature* (1967). 214, 764-776.
18. Gibbons, R., Hunter, G. Nature of The Scrapie Agent. *Nature* (1967). 215, 1041-1043.
19. Griffith, J. Nature of the Scrapie Agent: Self-Replication and Scrapie. *Nature* (1968). 215, 1043-1044.

20. Prusiner, S. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science* (1982). 216, 136-144.
21. Prusiner, S. Prions: Novel Infectious Pathogens. *Advances in Virus Research* (1984). 29, 1-56.
22. Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J. Identification of Scrapie Prion Protein-Specific mRNA in Scrapie-Infected and Uninfected Brain. *Nature* (1985). 315(6017), 331-333.
23. Robakis, N., Sawh, P., Wolfe, G., Rubenstein, R. Isolation of a cDNA Clone Encoding the Leader Peptide of Prion Protein and Expression of the Homologous Gene In Various Tissues. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* (1986). 83(17), 6377-6381.
24. Sparkes, R., Simon, M., Cohn, V., Fournier, R. Assignment of the Human and Mouse Prion Protein Genes to Homologous Chromosomes. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* (1986). 83(19), 7358-7362.
25. Vollmert, C., Windl, O., Xiang, W., Rosenberger, A., Zerr, I., Wichmann, H., *et al.* Kretzschmar, H. Significant Association of a M129V Independent Polymorphism in the 59 UTR of the *PRNP* Gene with Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in a Large German Case-Control Study. *Journal of Medical Genetics* (2006). 43(53)
26. *Ensembl Genome Browser*. (2012). Acceso en Septiembre, 2012, Desde <http://www.ensembl.org/>
27. NCBI. (2012). *PRNP Prion Protein [Homo Sapiens]*. Acceso en Septiembre, 2012, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5621>
28. Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D., *et al.* Weissmann, C. Scrapie and Cellular PrP Isoforms Are Encoded by the Same Chromosomal Gene. *Cell* (1986). 46, 417-428.

29. Mahal, S., Asante, E., Antoniou, M., Collinge, J. Isolation and Functional Characterization of the Promoter Region of the Human Prion Protein Gene. *Gene* (2001). 268, 104-114.
30. Shyu, W., Kao, M., Chou, W., Hsu, Y., Soong, B. Heat Shock Modulates Prion Protein Expression in Human NT-2 Cells. *Molecular Neuroscience* (2000). 11(4), 771-774.
31. Haigh, C., Brown, D. Regulation of Prion Protein Expression: A Potential Site For Therapeutic Intervention in the Transmissible Spongiform Encephalopathies. *International Journal of Biomedical Science* (2006). 2(4), 315-323.
32. Shyu, W., Lin, S., Saeki, K., Kubosaki, A. Hyperbaric Oxygen Enhances the Expression of Prion Protein and Heat Shock Protein 70 in a Mouse Neuroblastoma Cell Line. *Cellular and Molecular Neurobiology* (2004). 24(2), 257.
33. Shyu, W., Chen, C., Saeki, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Onodera, T., *et al.* Li, H. Hypoglycemia Enhances the Expression of Prion Protein and Heat-Shock Protein 70 in A Mouse Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Neuroscience Research* (2005). 80, 887-894.
34. Wang, V., Chuang, T., Hsu, Y., Chou, W., Kao, M. Nitric Oxide Induces Prion Protein Via MEK And P38 MAPK Signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005). 333, 95-100.
35. McLennan, N., Brennan, P., McNeil, A., Davies, I., Fotheringham, A., Rennison, K., *et al.* Bell, J. Prion Protein Accumulation And Neuroprotection In Hypoxic Brain Damage. *American Journal of Pathology* (2004). 165(1), 227-235.
36. Rybner, C., Hillion, J., Sahraoui, T., Lanotte, M., Botti, J. All-Trans Retinoic Acid Down-Regulates Prion Protein Expression Independently Of Granulocyte Maturation. *Leukemia* (2002). 16, 940-948.

37. Harrison, P., Khachane, A., Kumar, M. Genomic Assessment Of The Evolution Of The Prion Protein Gene Family In Vertebrates. *Genomics* (2010). 95, 268-277.
38. Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., Von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T., *et al.* Schätzl, H. Analysis Of 27 Mammalian And 9 Avian Prps Reveals High Conservation Of Flexible Regions Of The Prion Protein. *Journal Of Molecular Biology* (1999). 289, 1163-1178.
39. Van Der Kamp, M., Daggett, V. The Consequences of Pathogenic Mutations To The Human Prion Protein. *Protein Engineering, Design Selection* (2009). 22(8), 461-468.
40. Mehrpour, M., Codogno, P. Prion Protein: From Physiology To Cancer Biology. *Cancer Letters* (2010). 290, 1-23.
41. Stewart, R., Harris, D. Mutational Analysis Of Topological Determinants In Prion Protein (Prp) And Measurement Of Transmembrane And Cytosolic Prp During Prion Infection. *The Journal Of Biological Chemistry* (2003). 278(46), 45960-45968.
42. Westergard, L., Christensen, H., Harris, D. The Cellular Prion Protein (Prp^c): Its Physiological Function And Role In Disease. *Biochimica Et Biophysica Acta* (2007). 1772(6), 629-644.
43. Drisaldi, B., Stewart, R., Adles, C., Stewart, L., Quaglio, E., Biasini, E., *et al.* Harris, D. Mutant Prp Is Delayed In Its Exit From The Endoplasmic Reticulum, But Neither Wild-Type Nor Mutant Prp Undergoes Retrotranslocation Prior To Proteasomal Degradation. *Journal Of Biological Chemistry* (2003). 278(24), 21732-21743.
44. Nicolas, O., Gavín, R., Del Río, J. New Insights Into Cellular Prion Protein (Prp^c) Functions: The “Ying And Yang” Of A Relevant Protein. *Brain Research Reviews* (2009). 61, 170-184.
45. Barrenetxea, G. Iatrogenic Prion Diseases In Humans: An Update. *European Journal Of Obstetrics Gynecology And Reproductive Biology* (2012).

46. Colby, D., Prusiner, S. Prions. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* (2011).
3
47. Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C., Leblanc, A. Prion Protein Protects Human Neurons Against Bax-Mediated Apoptosis. *Journal Of Biological Chemistry* (2001). 279, 3914539149-39149.
48. Rocou, X., Guo, Q., Zhang, Y., Goodyer, C., Leblanc, A. Cytosolic Prion Protein Is Not Toxic And Protects Against Bax-Mediated Cell Death In Human Primary Neurons. *Journal Of Biological Chemistry* (2003). 278, 40877-40881.
49. Li, A., Harris, D. Mammalian Prion Protein Suppresses Bax-Induced Cell Death In Yeast. *Journal Of Biological Chemistry* (2005). 280, 17430-17434.
50. Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., *et al.* Weissmann, C. Expression Of Amino-Terminally Truncated Prp In The Mouse Leading To Ataxia And Specific Cerebellar Lesions. *Cell* (1998). 93, 203-214.
51. Li, A., Christensen, H., Stewart, L., Roth, K., Chiesa, R., Harris, D. Neonatal Lethality In Transgenic Mice Expressing Prion Protein With A Deletion Of Residues 105-125. *The EMBO Journal* (2007). 26, 548-558.
52. Brown, D., Schulzschaeffer, W., Schmidt, B., Kretzschmar, H. Prion Protein-Deficient Cells Show Altered Response To Oxidative Stress Due To Decreased SOD-1 Activity. *Experimental Neurology* (1997). 146, 104-112.
53. Brown, D., Nicholas, R., Canevari, L. Lack of Prion Protein Expression Results In A Neuronal Phenotype Sensitive To Stress. *Journal Of Neuroscience Research* (2002). 67, 211-224.
54. Walter, E., Chattopadhyay, M., Millhauser, G. The Affinity Of Copper Binding To The Prion Protein Octarepeat Domain: Evidence For Negative Cooperativity. *Biochemistry* (2006). 45, 13083-13092.

55. Pauly, P., Harris, D. Copper Stimulates Endocytosis Of The Prion Protein. *Journal Of Biological Chemistry* (1998). 273, 33107-33110.
56. Taylor, D., Hooper, N. The Prion Protein And Lipid Rafts. *Molecular Membrane Biology* (2006). 23(1), 89-99.
57. Colling, S., Khana, M., Collinge, J., Jefferys, J. Mossy Fibre Reorganization In The Hippocampus Of Prion Protein Null Mice. *Brain Research* (1997). 755, 28-35.
58. Tobler, I., Gaus, S., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Oesch, B. M., P., Manson, J. Altered Circadian Activity Rhythms And Sleep In Mice Devoid Of Prion Protein. *Nature* (1996). 380, 639-642.
59. Criado, J., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J., Wills, D., Henriksen, S., et al. Oldstone, M. Mice Devoid Of Prion Protein Have Cognitive Deficits That Are Rescued By Reconstitution Of Prp In Neurons. *Neurobiology Of Disease* (2005). 19, 255-265.
60. Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., Schachner, M. Prion Protein Recruits Its Neuronal Receptor NCAM To Lipid Rafts To Activate P59fyn And To Enhance Neurite Outgrowth. *Journal Of Cell Biology* (2005). 169, 341-354.
61. Mangé, A., Milhavet, O., Umlauf, D., Harris, D., Lehmann, S. Prp-Dependent Cell Adhesion In N2a Neuroblastoma Cells. *FEBS Letters* (2002). 514, 159-162.
62. Makrinou, E., Collinge, J., Antoniou, M. Genomic Characterization Of The Human Prion Protein (Prp) Gene Locus. *Mammalian Genome* (2002). 13, 696-703.
63. Watts, J., Drisaldi, B., Ng, V., Yang, J., Strome, B., Horne, P., et al. Westaway, D. The CNS Glycoprotein Shadoo Has Prp^c-Like Protective Properties And Displays Reduced Levels In Prion Infections. *The EMBO Journal* (2007). 26, 4038-4050.
64. Qin, K., O'Donnell, M., Zhao, R. Doppel: More Rival Than Double To Prion. *Neuroscience* (2006). 141, 1-8.

65. Premzl, M., Gamulin, V. Comparative Genomic Analysis Of Prion Genes. *BMC Genomics* (2007). 8(1)
66. NCBI. (2012). *PRNT Prion Protein (Testis Specific) [Homo Sapiens]*. Acceso en Septiembre, 2012, desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/149830>
67. Bueler, H. Normal Development And Behaviour Of Mice Lacking The Neuronal Cell-Surface Prp Protein. *Nature* (1992). 356, 577-582.
68. Soto, C., Satani, N. The Intricate Mechanisms Of Neurodegeneration In Prion Diseases. *Trends In Molecular Medicine* (2011). 17(1), 14-24.
69. Corsaro, A., Thellung, S., Villa, V., Nizzari, M., Florio, T. Role Of Prion Protein Aggregation In Neurotoxicity. *International Journal Of Molecular Sciences* (2012). 13, 8648-8669.
70. Aguzzi, A., Heppner, F. Pathogenesis Of Prion Diseases: A Progress Report. *Cell Death And Differentiation* (2000). 7, 889-902.
71. Fornai, F., Ferrucci, M., Gesi, M., Bandettini Di Poggio, A., Giordi, F., Biagioni, F., Paparelli, A. A Hypothesis On Prion Disorders: Are Infectious, Inherited, And Sporadic Causes So Distinct? *Brain Research Bulletin* (2006). 69, 95-100.
72. Aguzzi, A., Polymenidou, M. Mammalian Prion Biology: One Century Of Evolving Concepts. *Cell* (2004). 116, 313-327.
73. Mead, S. Prion Disease Genetics. *European Journal Of Human Genetics* (2006). 14, 273-281.
74. Parchi, P., Strammiello, R., Giese, A., Kretzschmar, H. Phenotypic Variability Of Sporadic Human Prion Disease And Its Molecular Basis: Past, Present, And Future. *Acta Neuropathologica* (2011). 121, 91-112.
75. Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., Devoe, A., Streeten, B., Cowen, D. Possible Person-To-Person Transmission Of Creutzfeldt-Jakob Disease. *The New England Journal Of Medicine* (1974). 290, 692-693.

76. Will, R. Acquired Prion Disease: Iatrogenic CJD, Variant CJD, Kuru. *British Medical Bulletin* (2003). 66, 255-265.
77. Will, R., Ironside, J., Zeidler, M., Cousens, S., Estibeiro, K., Alperovitch, A., et al. Smith, P. A New Variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK. *The Lancet* (1996). 347, 921-925.
78. Wroe, S., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., et al. Collinge, J. Clinical Presentation And Pre-Mortem Diagnosis Of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Associated With Blood Transfusion: A Case Report. *The Lancet* (2006). 368, 2061-2067.
79. Mastrianni, J., Nixon, R., Layzer, R., Telling, G., Han, D., Dearmond, S., Prusiner, S. Prion Protein Conformation In A Patient With Sporadic Fatal Insomnia. *The New England Journal Of Medicine* (1999). 340(21), 1630-1638.
80. Maddison, B., Baker, C., Rees, H., Terry, L., Thorne, L., Bellworthy, S., Gough, K., et al. Prions Are Secreted In Milk From Clinically Normal Scrapie-Exposed Sheep. *Journal Of Virology* (2009). 83(16), 8293-8296.
81. Collinge, J., Whitfield, J., McKintosh, E., Beck, J., Mead, S., Thomas, D., Alpers, M. Kuru In The 21st Century—An Acquired Human Prion Disease With Very Long Incubation Periods. *The Lancet* (2006). 367, 2068-2074.
82. Goldfarb, L. Kuru: The Old Epidemic In A New Mirror. *Microbes And Infection* (2002). 4, 875-882.
83. Organización Mundial De La Salud. *Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) And Variant CJD (Vcjd)*. (2007). Acceso En Octubre, 2012, desde <http://www.who.int/zoonoses/diseases/creutzfeldt.pdf>
84. Villegas, C. Enfermedades Por Priones: De La Clínica A La Biología Molecular. *Acta Neurologica Colombiana* (2012). 26, 87-111.

85. Zerr, I., Kallenberg, K., Summers, M., Romero, C., Taratuto, A., Heinemann, U., *et al.* Sanchez-Juan, P. Updated Clinical Diagnostic Criteria For Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Brain* (2009). 132, 2659-2668.
86. Skinningsrud, A., Stenset, V., Gundersen, A., Fladby, T. Cerebrospinal Fluid Markers In Creutzfeldt-Jakob Disease. *Cerebrospinal Fluid Research* (2008). 5(14)
87. Van Hemert, M., Steensma, Y., Van Heusden, P. 14-3-3 Proteins: Key Regulators Of Cell Division, Signalling And Apoptosis. *Bioessays* (2001). 23(10), 936-946.
88. Gmitterová, K., Heinemann, U., Bodemer, M., Krasnianski, A., Meissner, B., Kretzschmar, H. 14-3-3 CSF Levels In Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Differ Across Molecular Subtypes. *Neurobiology Of Aging* (2009). 30, 1842-1852.
89. Poser, S., Mollenhauer, B., Krauß, A., Zerr, I., Steinhoff, B., Schroeter, A., *et al.* Felgenhauer, K. How To Improve The Clinical Diagnosis Of Creutzfeldt-Jakob Disease. *Brain* (1999). 122, 2345-2351.
90. Wieser, H., Schindler, K., Zumsteg, D. EEG In Creutzfeldt-Jakob Disease. *Clinical Neurophysiology* (2006). 117, 935-951.
91. Mastrianni, J. Genetic Prion Diseases. En R. Pagon, T. Bird C. Dolan (Editores.), *Genereviews [Internet]*. Seattle, 2003 (Actualizado en Septiembre, 2010).
92. Pocchiari, M., Schmittingerand, S., Masullo, C. Amphotericin B Delays The Incubation Period Of Scrapie In Intracerebrally Inoculated Hamsters. *Journal of General Virology* (1987). 68, 219-223.
93. Mangé, A., Nishida, N., Milhavet, O., McMahon, H., Casanova, D., Lehmann, S. Amphotericin B Inhibits The Generation Of The Scrapie Isoform Of The Prion Protein In Infected Cultures. *Journal of Virology* (2000). 74(7), 3135-3140.
94. Todd, N., Morrow, J., Doh-Ura, K. Cerebroventricular Infusion of Pentosan Polysulphate In Human Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Journal of Infection* (2005). 50(5), 394-396.

95. Imran, M., Mahmood, S. An Overview of Animal Prion Diseases. *Virology Journal* (2011). 8(493)
96. Beck, J., Mead, S., Campbell, T., Dickinson, A., Wientjens, D., Croes, E., *et al.* Collinge, J. Two-Octapeptide Repeat Deletion Of Prion Protein Associated With Rapidly Progressive Dementia. *Neurology* (2001). 57(2), 354-356.
97. Capellari, S., Parchi, P., Wolff, B., Campbell, J., Atkinson, R., Posey, D., *et al.* Gambetti, P. Creutzfeldt-Jakob Disease Associated With A Deletion Of Two Repeats In The Prion Protein Gene. *Neurology* (2002). 59(10), 1628-1630.
98. Demarco, M., Daggett, V. Molecular Mechanism For Low Ph Triggered Misfolding Of The Human Prion Protein. *Biochemistry* (2007). 46, 3045-3054.
99. Kim, S., Hegde, S. Cotranslational Partitioning Of Nascent Prion Protein Into Multiple Populations At The Translocation Channel. *Molecular Biology of the Cell* (2002). 13, 3775-3786.
100. Watzlawik, J., Skora, L., Frense, D., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Schulz-Schaeffer, W., Kramer, M. Prion Protein Helix1 Promotes Aggregation But Is Not Converted Into Beta-Sheet. *Journal of Biological Chemistry* (2006). 281(40), 30242-30250.
101. Heske, J., Heller, U., Winklhofer, K., Tatzelt, J. The C-Terminal Globular Domain Of The Prion Protein Is Necessary And Sufficient For Import Into The Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* (2004). 279(7), 5435-5443.
102. Zanusso, G., Petersen, R., Jin, T., Jing, Y., Kanoush, R., Ferrari, S., *et al.* Singh, N. Proteasomal Degradation and N-Terminal Protease Resistance of the Codon 145 Mutant Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry* (1999). 274(33), 23396-23404.
103. Goldfarb, L., Petersen, R., Tabaton, M., Brown, P., Leblanc, A., Montagna, P., *et al.* Pendelbury, W. Fatal Familial Insomnia and Familial Creutzfeldt-Jakob disease:

- Disease Phenotype Determined by a DNA Polymorphism. *Science* (1992). 258(5083), 806-808.
104. Grasbon-Frodl, E., Lorenz, H., Mann, U., Nitsch, R., Windl, O., Kretschmar, H. Loss of Glycosylation Associated With the T183A Mutation in Human Prion Disease. *Acta Neuropathologica* (2004). 108, 476-484.
105. Kiachopoulos, S., Bracher, A., Winklhofer, K., Tatzelt, J. Pathogenic Mutations Located In The Hydrophobic Core Of The Prion Protein Interfere With Folding And Attachment Of The Glycosylphosphatidylinositol Anchor. *Journal of Biological Chemistry* (2005). 280(10), 9320-9329.
106. Santini, S., Claude, J., Audic, S., Derreumaux, P. Impact Of The Tail And Mutations G131V And M129V On Prion Protein Flexibility. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* (2003). 51, 258-265.
107. Chasseigneaux, S., Haik, S., Laffont-Proust, I., De Marco, O., Lenne, M., Brandel, J., *et al.* Peoc'h, K. V180I Mutation Of The Prion Protein Gene Associated With Atypical PrP^{Sc} Glycosylation. *Neuroscience Letters* (2006). 408, 165-169.
108. Apetri, A., Surewicz, K., Surewicz, W. The Effect of Disease-Associated Mutations on the Folding Pathway of Human Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry* (2004). 279(17), 18008-18014.
109. Zaidi, S., Richardson, S., Capellari, S., Song, L., Smith, M., Ghetti, B., *et al.* Petersen, R. Characterization Of The F198S Prion Protein Mutation: Enhanced Glycosylation And Defective Refolding. *Journal of Alzheimer's Disease* (2005). 7(2), 159-180.
110. Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Horneman, S., Glockshuber, R., Wüthrich, K. Prion Protein NMR Structure and Familial Human Spongiform Encephalopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1998). 95, 11667-11672.

111. Liemann, S., Glockshuber, R. Influence Of Amino Acid Substitutions Related To Inherited Human Prion Diseases On The Thermodynamic Stability Of The Cellular Prion Protein. *Biochemistry* (1999). 38(11), 3258-3267.
112. Gu, Y., Singh, A., Bose, S., Singh, N. Pathogenic Mutations In The Glycosylphosphatidylinositol Signal Peptide Of PrP Modulate Its Topology In Neuroblastoma Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* (2008). 37(4), 647-656.
113. García, L. Identificación De Mutaciones Y Polimorfismos En El Gen PRNP En Pacientes Con Demencia De Rápida Evolución. *Tesis*, Facultad De Química, Universidad Nacional Autónoma De México, México, D.F. 2011.
114. Bishop, M., Pennington, C., Heath, C., Will, R., Knight, R. *PRNP* Variation In UK Sporadic And Variant Creutzfeldt-Jakob Disease Highlights Genetic Risk Factors And A Novel Non-Synonymous Polymorphism. *BMC Medical Genetics* (2009). 10(146)
115. Nurmi, M., Bishop, M., Strain, L., Brett, F., McGuigan, C., Hutchison, M., *et al.* Haltia, M. The Normal Population Distribution of *PRNP* Codon 129 Polymorphism. *Acta Neurologica Scandinavica* (2003). 108, 374-378.
116. Alperovitch, A., Zerr, I., Pocchiari, M., Mitrová, E., De Pedro Cuesta, J., Hegyi, I., *et al.* Will, R. Codon 129 Prion Protein Genotype And Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *The Lancet* (1999). 353, 1673-1674.
117. Brandel, J., Preece, M., Brown, P., Croes, E., Laplanche, J., Agid, Y., *et al.* Alperovitch, A. Distribution of Codon 129 Genotype in Human Growth Hormone-Treated CJD Patients in France and the UK. *The Lancet* (2003). 362, 128-130.
118. Cervenakova, L., Goldfarb, L., Garruto, R., Lee, H., Gajdusek, D., Brown, P. Phenotype-Genotype Studies In Kuru: Implications For New Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Proceedings of The National Academy Of Sciences of The United States of America* (1998). 95, 13239-13241.

119. Bishop, M., Hart, P., Aitchison, L., Baybutt, H., Plinston, C., Thomson, V., *et al.* Manson, J. Predicting Susceptibility And Incubation Time Of Human-To-Human Transmission Of Vcjd. *The Lancet* (2006). 5(5), 393-398.
120. Hardy, J., Scholz, S., Evans, W., Goldfarb, L., Singleton, A. Prion Genotypes In Central America Suggest Selection For The V129 Allele. *American Journal Of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* (2009). 141B, 33-35.
121. Mead, S., Stumpf, M., Whitfield, J., Beck, J., Poulter, M., Campbell, T., *et al.* Collinge, J. Balancing Selection At The Prion Protein Gene Consistent With Prehistoric Kurulike Epidemics. *Science Express* (2003).
122. Soldevila, M., Calafell, F., Andrés, A., Yagüe, J., Helgason, A., Stefánsson, K., Bertranpetit, J. Prion Susceptibility And Protective Alleles Exhibit Marked Geographic Differences. *Human Mutation* (2003). 628
123. Beck, J., Poulter, M., Campbell, T., Adamson, G., Uphill, J., Guerreiro, R., *et al.* Mead, S. *PRNP* Allelic Series From 19 Years Of Prion Protein Gene Sequencing At The MRC Prion Unit. *Human Mutation* (2010). 31, E1551-E1563.
124. Lukic, A., Beck, J., Joiner, S., Feranley, J., Sturman, S., Brandner, S., *et al.* Mead, S. Heterozygosity At Polymorphic Codon 219 In Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Archives of Neurology* (2010). 67(8), 1021-1023.
125. Windl, O., Kretzschmar, H. Prion Diseases. En S. Pulst (Editor), *Neurogenetics* New York: Oxford University Press. 2000. Pp. 191-218.
126. Liang, J., Wang, J., Pan, Y., Wang, J., Liu, L., Guo, X., *et al.* Fan, D. High Frequency Occurrence of 1-OPRD Variant of *PRNP* Gene In Gastric Cancer Cell Lines And Chinese Population With Gastric Cancer. *Cell Biology International* (2006). 30, 920-923.

127. Franco, J. Análisis Molecular Del Gen PRNP De La Proteína Prión. Tesis Facultad De Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma De México, Cuautitlán Izcalli, Estado De México, 2007.
128. Furukawa, H., Kitamoto, T., Tanaka, Y., Tateishi, J. New Variant Prion Protein In A Japanese Family With Gerstmann-Sträussler Syndrome. *Molecular Brain Research* (1995). 30, 385-388.
129. Prion repeat region: Origin of deletions and insertions. (1997). Acceso en Noviembre, 2012, desde <http://www.mad-cow.org/deletions.html>
130. Palmer, M., Mahal, S., Campbell, T., Hill, A., Sidle, K., Laplanche, J. Deletions In The Prion Protein Gene Are Not Associated With CJD. *Human Molecular Genetics* (1993). 2(5), 541-544.
131. Salvatore, M., Genuardo, M., Petraroli, R., Masullo, C., D'Alessandro, M., Pocchiari, M. Polymorphisms of The Prion Protein Gene In Italian Patients With Creutzfeldt-Jakob Disease. *Human Genetics* (1994). 94, 375-379.
132. Erginel-Unaltuna, N., Peoc'h, K., Komurcu, E., Acuner, T., Issever, H., Laplanche, J. Distribution of the M129V Polymorphism of the Prion Protein Gene in a Turkish Population Suggests a High Risk For Creutzfeldt-Jakob Disease. *European Journal of Human Genetics* (2001). 9, 965-968.
133. Yu, S., Jin, L., Sy, M., Mei, F., Kang, S., Sun, G., et al. Xiao, G. Polymorphisms of the PRNP Gene in Chinese Populations and the Identification of a Novel Insertion Mutation. *European Journal of Human Genetics* (2004). 12, 867-870.
134. Wu, Y., Brown, W., Robakis, N., Dobkin, C., Devine-Gage, E., Merz, P., Wisniewski, H. PvuII RFLP Detected in the Human Prion Protein (PrP) Gene. *Nucleic Acids Research* (1987). 15(7), 3191.

135. Palmer, M., Van Leeven, R., Sukhvir, M., Campbell, T. H., C., Collinge, J. Sequence Variation in Intron of Prion Protein Gene, Crucial for Complete Diagnostic Strategies. *Human Mutation* (1996). 7, 280-281.
136. Palmer, M., Dryden, A., Hughes, J., Collinge, J. Homozygous Prion Protein Genotype Predisposes to Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Nature* (1991). 352, 340-342.
137. Laplanche, J., Delasnerie-Lauprêtre, N., Brandel, J. Molecular Genetics of Prion Diseases in France. *Neurology* (1994). 44, 2347-2351.
138. Deslys, J., Marcé, D., Dormont, D. Similar Genetic Susceptibility in Iatrogenic And Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Journal of General Virology* (1994). 75, 23-27.
139. Zimmermann, K., Turecek, P., Schwarz, H. Genotyping of the Prion Protein Gene at Codon 129. *Acta Neuropathologica* (1999). 97, 355-358.
140. Combarros, O., Sánchez-Guerra, M., Llorca, J., Álvarez-Arcaya, A., Berciano, J., Peña, N., Fernández-Viadero, C. Polymorphism at Codon 129 of the Prion Protein Gene is Not Associated with Sporadic AD. *Neurology* (2000). 55(4), 593-595.
141. Plaitakis, A., Viskadouraki, A., Tzagournissakis, M., Zaganas, I., Verghese-Nikolakaki, S., Karagiorgis, V., et al. Sklaviadis, T. Increased Incidence of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease on the Island of Crete Associated with a High Rate of PRNP 129-Methionine Homozygosity in the Local Population. *Annals of Neurology* (2001). 50(2), 227-233.

10. Apéndices

10.1 Reactivos

- Acrilamida-Bisacrilamida 40% (Acrilamida 386.7 g, bisacrilamida 13.3 g, agua C.B.P. 1 L)
- Agarosa ultrapura (Promega)
- Agua libre de nucleasas
- Amortiguador de carga
- Amortiguador de lisis de glóbulos rojos, BLGR (Cloruro de amonio 8.28 g, bicarbonato de potasio 1 g, EDTA 200 mL, agua C.B.P. 1L, pH final = 7.4)
- Amortiguador Tris-Boratos-EDTA, TBE 10X (Tris base 108 g, EDTA 9.3 g, ácido bórico 55 g, agua C.B.P. 1L)
- Bromuro de etidio [10 mg/mL]
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (49:1)
- Enzimas de restricción: *PvuII*, *XbaI* (*NcoI*) [Fermentas]
- Kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Kit purificación secuencia
- Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN)
- Oligonucleótido sentido: 5'-GATGCTGGTTCTCTTTGTGG-3'
- Oligonucleótidos reverso:
 - 5'- CCCACTATCAGGAAGATGAG-3' (producto de 738 pb)
 - 5'- GGGTAACGGTGCATGTTTTACAG-3' (producto de 452 pb)
- Dodecilsulfato de sodio, SDS 10%

10.2 Equipo y materiales

- Agitador: Daigger Vortex Genie 2
- Balanza: Denver Instrument Company AA200
- Cámaras de electroforesis
- Centrífugas: Eppendorf 5810R, Eppendorf 5415D
- Concentrador al vacío: Eppendorf 5301
- Cuantificador de DNA: Thermo Scientific NanoDrop 2000
- Fotodocumentador: Bio-Rad Gel Doc XR+
- Fuente de poder: Bio-Rad PowerPac 3000
- Secuenciador: ABI PRISM 3130
- Termocicladores: Applied Biosystems 2720, Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
- Termomezclador: Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf Thermomixer Compact
- Transiluminador: Labnet DyNA Light
- Tubos *Vacutainer* con polianetol sulfato de sodio, citrato de sodio y dextrosa como aditivos anticoagulantes