



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *PRNP*
DE LA PROTEÍNA PRIÓN**

T E S I S

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

P R E S E N T A :

JOSÉ LUIS FRANCO RUIZ

A S E S O R E S :

M EN C. PETRA YESCAS GÓMEZ

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Análisis Molecular del Gen PRNP de la Proteína prión.

que presenta el pasante: José Luis Franco Ruíz
con número de cuenta: 09852868-8 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Septiembre de 2007

PRESIDENTE	Dra. Gilda Flores Rosales	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Laura Martino Roaro	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Maritere Domínguez Rojas	

*"Los priones representan, en verdad, el triunfo de la investigación científica sobre el
prejuicio"*

S. B. Prusiner

*"La secuencia de aminoácidos determina de manera unívoca la estructura
terciaria de las cadenas polipeptídicas"*

J. Monod

Dogma Central de la Biología



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA

*Este trabajo fue realizado en el departamento de
Neurogenética y Biología Molecular del Instituto
Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel
Velasco Suárez"*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias a la colaboración generosa de numerosas personas, a las que me gustaría expresar mi agradecimiento, en especial: a Dios, a mi madre, a mi padre y a mis hermanos que ha estado siempre conmigo, a la Dra. Alonso, por permitirme ser parte de este proyecto y darme los consejos mas certeros; a la Dra. Yescas, por sus lecciones de ciencia y su apoyo incondicional; a todo el personal del Laboratorio de Neurogenética, y en particular a mis compañeros Agustín, Julio, Lourdes, Minerva, Roxana y Teresa que han sido parte de esta obra.

Quiero expresar también mi gratitud a muchos maestros y amigos que me han ayudado directa o indirectamente a través de discusiones y comentarios.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Gilda Flores por contagiarme la pasión que transmite haciendo lo que le gusta.

Agradezco, finalmente a todos aquellos que han proporcionado la información necesaria para la realización de este trabajo.

Te agradezco a ti...

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	i
Índice de figuras y tablas	ii
Glosario	iii
Resumen	iiii
I GENERALIDADES	
1.- Antecedentes de las enfermedades priónicas.....	1
2.- Enfermedad de Gerstmann Straüssler Scheinker.....	3
3.- Proteína prión PrP.....	5
4.- Proteína prión PrP ^C y sus alteraciones.....	6
5.- Diagnóstico de las enfermedades priónicas.....	15
II JUSTIFICACIÓN.....	17
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
IV METODOLOGÍA	
1.- Diagrama de Flujo.....	19
2.- Muestras biológicas.....	20
2.1.- Pacientes e individuos en riesgo.....	20
2.2.- Grupo control.....	20

3.- Toma de muestra.....	21
4.- Extracción de DNA por precipitación con sales y extracción con fenol-cloroformo.....	21
5.- Obtención de DNA por el kit comercial Aqua-Pure Bio-Rad.....	22
6.- Amplificación del fragmento de 738 pb y 452 pb.....	23
7.- Restricción enzimática.....	24
7.1.- Enzima de restricción Dde I mutación P102L.....	24
7.2.- Enzima de restricción Tai I polimorfismo M129V.....	24
8.- Purificación del producto de 452 pb obtenido en la PCR utilizando el kit comercial QIA-quick.....	25
9.- Reacción de secuenciación.....	26
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
VI CONCLUSIONES.....	36
VII BIBLIOGRAFÍA.....	37
A.- Sitios web.....	45

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
C-terminal	Extremo carboxilo terminal de una proteína
CJD	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
Dde I	Endonucleasa de restricción obtenida de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EEB	Encefalopatía espongiiforme bovina
FFI	Insomnio familiar fatal
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Gerstmann Straüssler Scheinker
kDa	Kilodaltones
M/M	Homocigoto para el aminoácido metionina
M/V	Heterocigoto para los aminoácidos metionina-valina
mg	Miligramos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mM	Milimolar
N-terminal	Extremo amino terminal de una proteína
ng	Nanogramos
nmol/µL	Concentración en nanomoles por microlitro
ORF	Marco de lectura abierta
P/P	Homocigoto para el aminoácido prolina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P/L	Heterocigoto para los aminoácidos prolina-leucina
PRNP	Gen de la proteína prión
PrP	Proteína prión
PrP^C	Proteína prión celular
PrP^{res}	Proteína prión resistente a proteasas
PrP^{sc}	Proteína prión scrapie
PrP^{sen}	Proteína prión sensible a proteasas
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RCLB	Amortiguador de lisis de células rojas
RFLP's	Polimorfismo de longitud variable de fragmentos de restricción
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tai I	Endonucleasa de restricción obtenida de <i>Thermus aquaticus</i>
TSE	Encefalopatía espongiiforme transmisible
V/V	Homocigoto para el aminoácido valina



FIGURAS

Figura 1	Estructura tridimensional de la proteína prión.....	5
Figura 2	Esquema representativo de la proteína prión celular.....	6
Figura 3	Esquema del mecanismos de internalización de la proteína prión celular PrP ^C	7
Figura 4	Digestión enzimática con proteinasa K de la proteína prión anormal	8
Figura 5	Esquema de la conversión de la proteína prión en células neuronales.....	9
Figura 6	Esquema representativo del cromosoma 20 y del gen <i>PRNP</i>	10
Figura 7	Esquema representativo del gen <i>PRNP</i>	11
Figura 8	Histopatología de las placas formadas en los diferentes patrones de tinción.....	16
Figura 9	Esquema de la extracción de DNA por la técnica de precipitación con sales y extracción con fenol-cloroformo.....	21
Figura 10	Esquema de la extracción de DNA por la técnica del kit comercial Aqua-Pure (Bio-Rad®).....	22
Figura 11	Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa.....	23
Figura 12	Esquema de la representación del corte con las enzimas de restricción Dde I y Tai I.....	24

Figura 13	Esquema de purificación de los productos de la PCR mediante el kit comercial QIA-quick.....	25
Figura 14	Esquema de la purificación del producto de secuenciación mediante columnas Centri-Cep.....	26
Figura 15	Esquema de la reacción de secuenciación automatizada.....	26
Figura 16	Gel de agarosa al 1.0% integridad del DNA.....	27
Figura 17	Gel de agarosa al 2.5% fragmentos 738 pb.....	28
Figura 18	Gel de agarosa al 2.5% fragmentos 452 pb.....	28
Figura 19	Gel de poliacrilamida al 6% enzima de restricción Dde I.....	29
Figura 20	Electroferograma de un homocigoto P/P.....	30
Figura 21	Electroferograma de un heterocigoto P/L.....	30
Figura 22	Gel de poliacrilamida al 6% enzima de restricción Tai I.....	31
Figura 23	Electroferograma de un homocigoto M/M.....	32
Figura 24	Electroferograma de un heterocigoto M/V.....	32
Figura 25	Electroferograma de un homocigoto V/V.....	32
Figura 26	Análisis de segregación en la familia estudiada.....	35

Tabla 1	Enfermedades humanas de etiología priónica.....	2
Tabla 2	Mutaciones en el gen de la proteína prión.....	12
Tabla 3	Características de las muestras estudiadas.....	20
Tabla 4	Fragmentos generados con la enzima Dde I para identificar individuos con la mutación P102L.....	29
Tabla 5	Fragmentos generados con la enzima Tai I para identificar el polimorfismo M129V.....	31
Tabla 6	Distribución genotípica M129V y la frecuencia del alelo metionina en la muestra estudiada.....	33
Tabla 7	Frecuencia del polimorfismo M129V en diferentes poblaciones estudiadas.....	34

Asesoramiento genético: Es un proceso de comunicación durante el cual se proporciona información al paciente acerca de un padecimiento genético específico, su historia natural, sus complicaciones más frecuentes, las posibilidades de tratamiento, su forma de herencia, los riesgos de que la enfermedad recurra en algún otro miembro de la familia y las posibles alternativas.

Ataxia: Trastorno caracterizado por una alteración en la capacidad de coordinar los movimientos. La marcha inestable y el desequilibrio postural están producidos por una lesión localizada en el cerebelo.


Ataxia espinocerebelosa: Enfermedad debida a la atrofia del cerebelo y caracterizada por ataxia, disartria y nistagmo.

Astrocitosis: Aumento del número de células de la neuroglía con proyecciones fibrosas y protoplasmáticas que se observa frecuentemente en un área irregular adyacente a las lesiones degenerativas.

Disartria: Dificultad para hablar con mala articulación de las palabras como resultado de una interferencia en el control de los músculos del leguaje, normalmente debido a la lesión de un nervio motor central o periférico.

Electroforésis: Es una técnica de separación que se basa en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en determinado medio a través de una matriz como resultado de la acción de un campo eléctrico.

Espasticidad: Aumento del tono o la rigidez del músculo debida a la lesión de las fibras piramidales estructurales o corticoespinales directas, asociadas a la de otros sistemas de fibras que discurren en íntima asociación con ellas. Constituye una forma de disminución de la pasividad neuromuscular y suele acompañarse de exaltación de los reflejos musculares clínicos.



Función de los ganglios basales: El sistema motor extrapiramidal es un mecanismo integrador de los movimientos involuntarios y de postura, principalmente modera los movimientos con la corteza cerebral y el tono muscular. Así las lesiones de dicho sistema producen hipertonía (exceso de tono muscular) y movimientos involuntarios.

Nistagmo: Espasmo clónico de los músculos motores del globo ocular, que produce movimientos involuntarios de éste en varios sentidos, horizontal, vertical, oscilatorio, rotatorio o mixto.

Paraplejía: Parálisis caracterizada por la pérdida motora o sensorial de las extremidades inferiores y del tronco.

Parestesia: Disturbios espontáneos de la sensibilidad subjetiva en forma de hormigueo, pinchazo, adormecimiento, producidas por la patología de cualquier sector de las estructuras del sistema nervioso central y periférico.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Consiste en la amplificación exponencial de DNA mediante el uso de una polimerasa termoestable y a través de la combinación cíclica de 3 temperaturas (desnaturalización, alineamiento y elongación) y el flanqueamiento mediante el uso de oligonucleótidos que son complementarios a los extremos del fragmento de interés.

Secuenciación automatizada: Consiste en efectuar la síntesis de 1 hebra de DNA que sea reactiva y complementaria de la hebra de la que se quiere determinar la secuencia. Su originalidad consiste en utilizar dideoxinucleótidos (ddNTP's) la cual se incorpora en una cadena en síntesis, pero no permite el crecimiento posterior de esta.



Las enfermedades por priones o encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE) son padecimientos neurodegenerativos que se presentan en forma esporádica, iatrogénica, y/o familiar que afectan a humanos y animales. En humanos incluye a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el Kuru, la enfermedad de Gerstmann Straüssler Scheinker y el insomnio familiar fatal, causados por cambios conformacionales en la proteína prión y mutaciones en el gen de la proteína prión.

El objetivo del presente trabajo fue analizar el gen *PRNP* de la proteína prión en una familia con 4 individuos afectados y sus familiares en riesgo, así como en 9 pacientes con probable diagnóstico de enfermedad por priones utilizando la técnica de PCR, la identificación por RFLP's y secuenciación automatizada. Se identificó la mutación P102L, donde existe una transversión del nucleótido citosina por timina (C→T) en los 4 pacientes y 7 individuos en riesgo de la misma familia, no encontrándose mutación en los 9 individuos con diagnóstico probable de enfermedad por priones.

Se analizó la frecuencia genotípica y alélica para el polimorfismo M129V del gen de la proteína prión en un grupo control (100 individuos sanos no relacionados entre sí, de la población mestiza mexicana), como también en los individuos en riesgo y pacientes de la muestra estudiada, encontrándose una frecuencia del 53% de heterocigocidad en individuos en riesgo y en pacientes con la mutación siendo similar esta frecuencia en el grupo control. Se compararon las frecuencias obtenidas en la muestra control con las reportadas en otras poblaciones no mostrando diferencias significativas.

En conclusión, se identificó la mutación P102L en el gen *PRNP* en pacientes de una familia con enfermedad de GSS, confirmándose este diagnóstico. Esta mutación produce un cambio de aminoácido (Pro→Leu) en el residuo 102 de la proteína prión, la segregación del polimorfismo M129V se asoció como un factor de riesgo para la enfermedad por priones en la familia estudiada.

I. GENERALIDADES



1 ANTECEDENTES DE ENFERMEDADES PRIÓNICAS

La primera descripción de una encefalopatía de tipo esponjiforme se remonta al siglo XVIII, y hace referencia al temblor del carnero o “scrapie”. Las ovejas afectadas mostraban irritabilidad y temblor, desarrollaban prurito, convulsiones, parálisis, ceguera y morían al cabo de unos meses; el análisis post-mortem de los cerebros de estos animales reveló espongiosis, es decir, la presencia de vacuolas ópticamente vacías en el tejido nervioso (Brown y cols., 1998; Aguzzi y cols., 2000).

Hans Gerhard Creutzfeldt y Adolf Jakob publicaron al inicio de los años 20's la descripción de algunos pacientes con síndromes neurológicos complejos, de evolución rápida y que aparentemente no correspondían a ninguna entidad de las conocidas hasta el momento (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). A partir de estas descripciones iniciales, fueron apareciendo otros casos, Heidehain en 1929 describe a 2 pacientes con cuadro de demencia rápidamente progresiva, mientras que J. Gerstmann, E. Straüssler e I. Scheinker en 1936 describieron a una familia con varios miembros fallecidos de ataxia cerebelosa y demencia progresiva (Heidehain y cols., 1929, Gerstmann y cols., 1936).

Vicent Zigas y Carletón Gajdusek en 1956 reportan una nueva variante encefálica observada en la tribu Fore de la isla de Papúa, en Nueva Guinea, que estaba asociada con el rito mortuorio de canibalismo; a esta enfermedad se le denominó Kuru (la palabra *Kuru* en lengua Fore significa temblor o escalofríos) (Gajdusek y cols., 1957).

En 1959, William Hadlow en una carta a la revista Lancet, establece el paralelismo entre el Kuru con el scrapie y plantea la posibilidad de intentar la transmisión experimental del Kuru (Hadlow, 1959). En respuesta, en 1966, Gajdusek y Gibbs inyectaron homogenados de cerebro con Kuru a chimpancés, los cuales desarrollaron los síntomas y los cambios neuropatológicos de la enfermedad confirmando la transmisibilidad (Gajdusek y cols., 1966; Gibbs y cols., 1968).

Las demostraciones de la transmisibilidad se completaría en años posteriores con la transmisión de la enfermedad de GSS, CJD y el Insomnio Familiar Fatal, una enfermedad familiar poco frecuente descrita por Lugaresi en 1986 (Lugaresi y cols., 1986).

La demostración de la transmisibilidad del Kuru y la CJD trajo consigo la concesión del Premio Nobel a Gajdusek en 1976 y puso fin al canibalismo entre los Fore de Papúa Nueva Guinea. Por lo que prácticamente desapareció el Kuru, pero permaneció la incógnita sobre la naturaleza del agente infeccioso implicado. En 1981, Merz y colaboradores, describen en cerebros de pacientes fibrillas anormales semejantes a las de “scrapie” y consideran que es la primera evidencia morfológica del agente infeccioso (Merz y cols., 1981).

Prusiner, en 1982 propuso que una fracción proteica era el origen de éstas enfermedades e introdujo el termino príon para enfatizar su naturaleza tanto proteica como infecciosa. En 1997, Stanley B. Prusiner fue galardonado con el premio Nobel de Fisiología y Medicina por estas investigaciones que proponían que el material proteico producía la enfermedad (Prusiner, 1998a).

Como antecedentes del trabajo de Prusiner es importante mencionar las aportaciones de T. Alper, que sugirió que el agente infeccioso podría ser una proteína, y de J. S. Griffith, que fue el primero en proponer la hipótesis de “proteína única” (*protein-only hypothesis*) (Griffith, 1967).

Las aportaciones realizadas hasta últimas fechas proponen que las enfermedades por priones pueden presentarse en animales y humanos. Los padecimientos en humanos son raros pero únicos, ya que pueden ser hereditarios, esporádicos y transmisibles [tabla 1](#) (Aguzzi y cols., 2006).

Tabla . Enfermedades humanas de etiología priónica y su patogenia

Enfermedad	Patogenia	Incidencia
Kuru	Infección a través de rituales de canibalismo.	
Creutzfeldt-Jacob iatrogénica	Infección por contaminación de: electrodos, hormona de crecimiento, transplantes de cornea, duramadre.	1%
Creutzfeldt-Jacob nueva variante	Infección por priones bovinos.	> 150 casos en el Reino Unido y pocos casos en otros países europeos.
Creutzfeldt-Jacob esporádica	Mutación somática o conversión espontánea de PrP ^C a PrP ^{SC} .	85-90%
Creutzfeldt-Jacob familiar	Mutación en el gen <i>PRNP</i> (codón E200K).	10-15%
Gerstmann Strüssler Scheinker	Mutación en el gen <i>PRNP</i> (codón P102L).	
Insomnio Familiar Fatal	Mutación en el gen <i>PRNP</i> (codón D178N acoplado al polimorfismo M129).	
Insomnio Familiar Fatal esporádico	Mutación somática o conversión espontánea de PrP ^C a PrP ^{SC} .	Muy pocos casos

(Tomada y modificada de: Aguzzi y cols., 2000; Prusiner, 2001)



2 ENFERMEDAD DE GERSTMANN STRAÜSSLER SCHEINKER [GSS MIM 137440]

En 1936, el neurólogo alemán J. Gerstmann y los neuropatólogos E. Straüssler y I. Scheinker, describieron por primera vez la enfermedad en una joven austríaca que presentó un síndrome cerebeloso y un deterioro intelectual moderado el cual se denominó síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS). El estudio genealógico de la paciente demostró que en 5 generaciones había 23 miembros afectados y se estableció que pertenecía a una variante de las encefalopatías humanas (Gerstmann y cols., 1936).

La enfermedad de GSS es una encefalopatía espongiiforme familiar caracterizada histopatológicamente por la presencia en el cerebelo de numerosas placas amiloides y cambios espongiiformes. Es un padecimiento neurodegenerativo, con un patrón de herencia autosómica dominante, causado por mutaciones en el gen de la proteína prión *PRNP* que se localizan en los codones P102L, P105L, A117V, G131V, Y145STOP, F198S y Q217R, también se pueden presentar inserciones entre los codones 51 y 91, pero son poco frecuentes (Hsiao y cols., 1989; Bianca y cols., 2003; Goldgaber y cols., 1989; Goldfarb y cols., 1992; Kitamoto y cols., 1993; Parchi y cols., 1998; Piccardo y cols., 2001; Panegyres y cols., 2001; Yamada y cols., 1999; Woulfe y cols., 2005).

Se ha estimado que tiene una incidencia de 2 por cada 100 millones, sin embargo, es probable que la frecuencia este subestimada, ya que se confunde con otras enfermedades degenerativas como las ataxias espinocerebelosas, paraparesia espástica y demencias por el acúmulo de placas amiloides (Hsiao y cols., 1989; Alonso y cols., 1998).

Clínicamente se caracteriza por un trastorno lentamente progresivo de ataxia espinocerebelosa reflejos ausentes en miembros inferiores y deterioro cognoscitivo. El inicio de la enfermedad se da en la cuarta y quinta década de la vida. En las etapas tempranas, la ataxia va progresando y se va haciendo más pronunciada conforme avanza la enfermedad debido por la pérdida neuronal que produce varios grados de atrofia de las regiones afectadas (Hsiao y cols., 1989; Bianca y cols., 2003; Woulfe y cols., 2005).

Otros síntomas pueden incluir disartria, nistagmos, espasticidad, alteraciones visuales y en algunas familias signos parkinsonianos característicos. La mayoría de los pacientes desarrollan demencia considerando que patológicamente las placas amiloides pueden o no asociarse con la degeneración espongiiforme o degeneración neurofibrilar (Parchi y cols., 1998).

El cuadro clínico es desalentador, ya que la pérdida degenerativa de la sustancia negra hace que la evolución de la enfermedad sea rápida, estimándose un período desde el inicio de la sintomatología hasta el fallecimiento del paciente, de entre 1 y 12 meses. Sin embargo, existen casos en los que la evolución es más lenta pudiendo durar varios años dependiendo del tipo de mutación y del factor de riesgo asociado al mismo (Alonso y cols., 1998).

El fenotipo clínico de la enfermedad de GSS esta ligada muy frecuentemente a la mutación en el codón 102 (P102L) con la sustitución del aminoácido prolina (CCG) por leucina (CTG) acoplada al polimorfismo en el codón 129 (M129V) en el que puede haber metionina (ATG) o valina (GTG), observándose que este polimorfismo puede influir en la patogénesis de la enfermedad mostrando heterogeneidad y variabilidad en la edad de inicio entre pacientes con la misma mutación, incluso la variabilidad en el fenotipo dentro de una misma familia sugiere que otros factores adicionales de la misma partícula proteica mutante pudieran estar involucrados (Bianca y cols., 2003; Young y cols., 1997).

Morfológicamente existen numerosas placas de la proteína príon anormal y el tipo de placa más característica es la denominada placa multicéntrica, que consiste en una gran masa de amiloide-PrP resistente a proteasas, rodeada de pequeños depósitos amiloides, encontrándose en gran número tanto en el cerebelo como en la capa granular y molecular. También pueden estar presentes en la sustancia blanca del cerebelo, corteza cerebral y ganglios basales, la localización de las lesiones es variable, dependiendo de la mutación que porta el individuo (Mishra y cols., 2002).

Su diagnóstico se basa en el estudio histopatológico de placas amiloides característicamente del tipo multicéntrico y en los cambios espongiiformes localizadas principalmente en el cerebro, corteza cerebelosa y ganglios basales así como la identificación de mutaciones en el gen *PRNP* en aquellos pacientes con diagnóstico probable de enfermedad por príon (Bianca y cols., 2003).

3 PROTEÍNA PRIÓN PrP

El término prión fue definido en 1982 por Prusiner como el agente infeccioso de las encefalopatías espongiformes transmisibles o enfermedades por priones. De acuerdo a Prusiner, el prión (de proteinaceous infectious only) no contiene ácidos nucleicos y consiste en una proteína “infecciosa” que es capaz de inducir una reacción de replegamiento de la proteína prión normal a una forma anormal altamente infecciosa (Prusiner, 1982).

Los priones son partículas proteicas resistentes a diversos agentes físicos y químicos, de ahí que surgiera la nomenclatura para identificar a la proteína anómala de la normal. Durante su proteólisis se produce una molécula de aproximadamente 142 aminoácidos (27-30 kDa) es hidrófoba y resistente a la acción de proteasas, llamada proteína prión resistente (PrP^{res}) o proteína prión “scrapie” (PrP^{sc}) la cual se agrega y forma placas amiloides (Prusiner, 1982, 1998b y 2001) y una llamada proteína prión sensible (PrP^{sen}) o proteína prión celular (PrP^c), proteína hidrófila de 253 aminoácidos (33-35 kDa) sensible a proteasas. (Diener y cols., 1982).

Estudios de la conformación, hechos en “scrapie” por espectroscopía de infrarrojo y difracción de rayos X de la proteína normal PrP^c y de la forma anormal PrP^{sc} concluyen que la proteína normal es predominantemente de conformación α -hélice (40%) y estructuras β -plegada cortas; mientras que PrP^{sc} tiene una conformación de lámina β -plegada (30-40%) y α -hélice (20-30%) (Pan y cols., 1993; Chesebro, 2002) **Figura 1**.

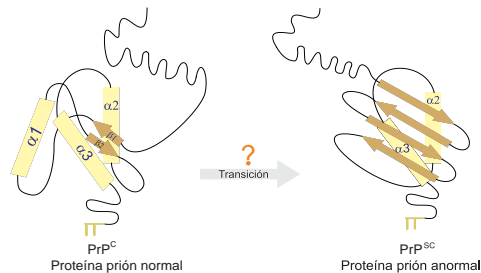


Figura 1 . Estructura tridimensional de la proteína prión. Se muestra del lado izquierdo el dominio estructurado de la proteína prión normal con sus α -hélices ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) y del lado derecho se muestra el cambio conformacional a láminas β -plegadas de la proteína prión. Tomada y modificada del sitio web www.obiniro.ac

4 PROTEÍNA PRIÓN PrP^C Y SUS ALTERACIONES

La proteína prión celular (PrP^C) es una glicoproteína de membrana plasmática, altamente conservada a lo largo de la escala filogenética. Está presente en los vertebrados y se expresa en varios tejidos y líneas celulares como el sistema nervioso, tejido muscular, sistema inmunitario, y en humanos se ha encontrado en sangre periférica (Aguzzi y cols., 2006; Hunter y cols., 2002).

La proteína PrP^C se expresa abundantemente en células neuronales tiene un peso de 33-35 kDa, es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y transportada vía gránulos secretorios del aparato de Golgi a la superficie de la célula neuronal donde se ancla a una glicosilfosfatidilinositol (GPI). A través del corte y empalme (splicing) de los exones, el RNAm genera una proteína de 253 aa que tiene un péptido señal de 22 aa que es removido al entrar al retículo endoplásmico y una secuencia en el C-terminal de 23 aa que se elimina durante la unión al GPI (Prusiner 1998a; Aguzzi y cols., 2006; Watts y cols., 2006).

La proteína de 253 aa sufre procesos postranscripcionales y generan una proteína madura de 202 aa que tiene 2 dominios; un dominio N-terminal no estructurado de aproximadamente 100 aa que incluye un región de octarepetidos (un nonapéptido y 4 octapéptidos repetidos que van desde el codón 51 hasta el 91 [P (Q/H) GGG (G/-) WGQ])) y una región central hidrofóbica; el segundo dominio estructurado contiene 2 sitios de glicosilación (asparagina 181 y 197) y un puente disulfuro interno, y tres regiones α -hélice y dos regiones cortas antiparalelas de láminas β -plegadas, como se muestran en la **Figura 2** (Aguzzi y cols., 2000; Taylor y cols., 2005).

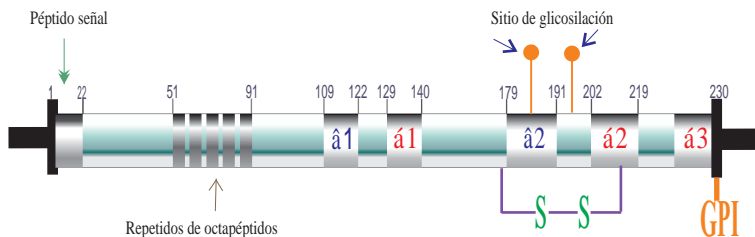


Figura 2. Esquema representativo de la proteína prión celular. Se muestra el dominio de octarepetidos, las regiones α -hélice, láminas β -plegadas y el dominio C-terminal donde se ancla la glicosilfosfatidilinositol (GPI).

La función de la proteína príon normal aún no se conoce y se ha sugerido que podría estar implicada en procesos tales como reconocimiento y adhesión celular, diferenciación neuronal, desarrollo embrionario, actividad linfocítica, función sináptica, ritmo circadiano, transcripción de genes, en la unión y transporte de componentes extracelulares, o en la señalización transmembranal (Jiménez-Huete y cols., 1998; Gauczynski y cols., 2002; Aguzzi y cols., 2006).

Se ha identificado que la PrP^C presenta una región con cierta afinidad por el ión cobre (Cu²⁺) entre los residuos 51-91 y que al unirse la PrP^C con el cobre forma un complejo que tiende a internalizarse y tras liberarlo vuelve a su posición en la superficie de la membrana plasmática, lo que sugiere una importante participación en la homeostasis de cobre ante el estrés oxidativo (Taylor y cols., 2005; Nadal y cols., 2007) **Figura 3.**

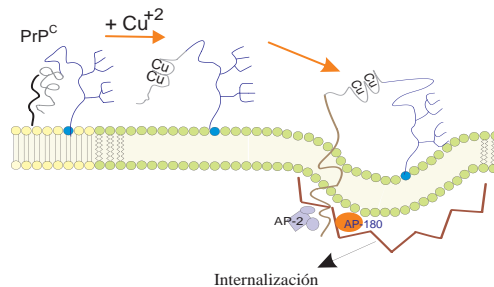


Figura 3. Esquema que muestra el mecanismo de internalización de la proteína príon celular (PrP^C). La región de octapéptidos repetidos de la PrP^C (gris) forma un complejo con el ión Cu²⁺, tras liberarlo vuelve a su posición en la superficie induciendo cambios conformacionales en la proteína príon. (Tomada y modificada de Taylor y cols., 2005).

In *vivo* la proteína príon (PrP) presenta dos isoformas; la proteína príon normal o PrP^C que posee actividad biológica y una proteína príon anormal o PrP^{SC} la cual es responsable de la acumulación y el depósito extracelular característico de la forma patológica (Prusiner 1998a).

La proteína príon anormal o “scrapie” (PrP^{SC}) deriva de su isoforma normal PrP^C por un evento postraduccional a un desconocido. A pesar de que ambas isoformas de la proteína príon presentan la misma secuencia de aminoácidos, la PrP^{SC} tiende a formar agregados fibrilares, multiméricos, insolubles y parcialmente resistentes a la degradación por proteasas que es la característica distintiva de la proteína príon anormal (Prusiner, 1998; Diener y cols., 1982).

El análisis de la estructura de la PrP^{Sc} realizado mediante el estudio electroforético de los fragmentos generados por la digestión con proteinasa K, revelan que la PrP^{Sc} pierde de 23 a 89 residuos de su extremo N-terminal generando un fragmento de 27 a 30 kDa (PrP 27-30), o fragmentos de 21 kDa y 19 kDa; esta diferencia en tamaño resulta de los sitios de corte de la proteína prión (Parchi y cols., 2000).

El fragmento purificado PrP 27-30, se polimeriza en filamentos que se pueden teñir con colorantes para carbohidratos. Mediante difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojo se ha determinado que la PrP 27-30 es rica en estructuras laminares β -plegadas (Watts y cols., 2006)

Figura 4.

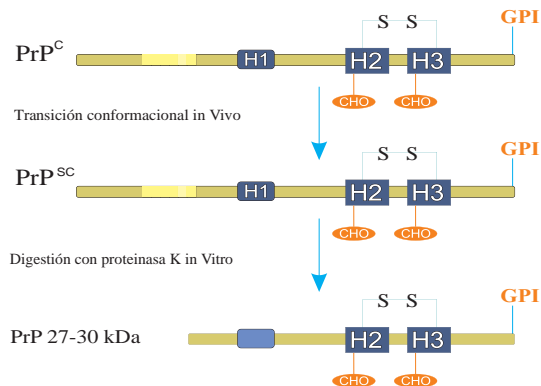


Figura 4. Digestión enzimática con proteinasa K de la proteína prión anormal. La cual genera un fragmento de 27-30 kDa en el dominio estructurado. Tomada y modificada de Watts y cols., 2006.

Todas las enfermedades priónicas comparten el mismo mecanismo patogénico básico que involucra la conversión de la proteína prión celular normal (PrP^C) en una forma infecciosa. La conversión de PrP^C a PrP^{Sc} puede involucrar un cambio conformacional de PrP^C de una forma predominantemente α -helicoidal en una estructura lámina β -plegada (Prusiner, 1982; 1998; Pan y cols., 1993; Aguzzi y cols., 2000). Sin embargo, los mecanismos exactos de la transición conformacional y agregación son aún desconocidos (De Armond y cols., 2002).

Para justificar la conversión de PrP^{C} en PrP^{SC} se han propuesto diversas hipótesis. La más aceptada es la propuesta por Prusiner en 1982 con la hipótesis de la proteína única. Esta hipótesis parte del supuesto de que tanto la PrP^{C} como la PrP^{SC} existen como moléculas aisladas (monómeros) o como asociaciones de 2 moléculas (dímeros) en estado de equilibrio. Si el dímero está constituido por una molécula de PrP^{C} y otra de PrP^{SC} , la segunda cataliza la conversión de PrP^{C} en PrP^{SC} , a medida que se repite ésta aumentará exponencialmente la proporción de PrP^{SC} en las vesículas lisosomales, que contienen el medio idóneo para que la proteína pierda su estructuración facilitando su conversión, de modo que al romperse los lisosomas liberan al medio PrP^{SC} y enzimas hidrolíticas, como consecuencia las neuronas degeneran y mueren. Producida la muerte de la neurona la PrP^{SC} pasaría al medio, del que sería captada por otra neurona y se reanudaría el proceso infeccioso y la destrucción celular (Prusiner, 1982) **Figura 5.**

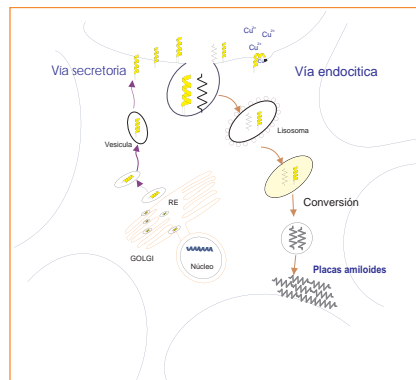


Figura 5. Esquema de la conversión de la proteína prión en células neuronales. Se muestran las modificaciones estructurales de la proteína prión normal a la forma patogénica (Tomada y modificada del sitio www.chemsoc.org)

También se ha propuesto que la modificación estructural podría ser el resultado de un proceso de polimerización en cadena, iniciado por la proteína prión anormal (PrP^{SC}) inoculada que actuaría como cristal iniciador que permitiría la agregación de la proteína prión normal (PrP^{C}). Sin embargo otros investigadores proponen la intervención de las proteínas chaperonas, que modificarían el plegamiento de PrP^{C} o de su precursor, la proteína prión anormal (PrP^{SC}) incluso podría ser una chaperona de la proteína prión normal (PrP^{C}) (Toro y cols., 2005; Tompa y cols., 1998).

El gen *PRNP* (OMIM 176640) de copia única fue identificado en roedores infectados con “scrapie” y el análisis reveló la existencia de un gen con los mismos patrones de restricción en DNA normal (Basler y cols., 1986).

La proteína prion PrP es codificada por el gen *PRNP* localizado en el brazo corto del cromosoma 20 (20pter-p12). Este gen se encuentra altamente conservado y se ha identificado en más de 13 especies de mamíferos (Oesch y cols., 1985; Chesebro y cols., 1985).

El gen *PRNP* está compuesto por dos exones (3 en ratón) que comprende el exón 1 no traducido de 136 pb, un intrón de aproximadamente 12693 pb y el exón 2 de 2354 pb contiene la región codificante de 750 pb.

La región 5' del sitio de inicio transcripcional tiene un sitio rico en GC, no tiene caja TATA, contiene una caja CCAAT y tiene un número putativo de sitios de unión a factores de transcripción como SPI, API y AP2, el codón de iniciación se localiza a 10 nucleótidos del extremo 3' del sitio aceptor del corte y empalme “splicing” lo que evita la interrupción del mensaje y la existencia de formas alternativas (Puckett y cols., 1991; Mahal y cols., 2001; Mead, 2006) **Figura 6**.

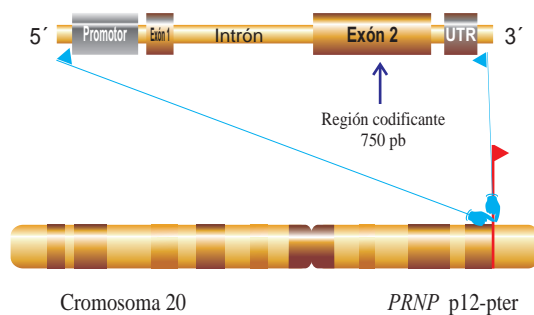


Figura 6. Esquema representativo del cromosoma 20 y del gen *PRNP* de la proteína prión. Se muestran la región promotora y la región codificante localizada en el exón 2 de aproximadamente 750 pb. (Tomada y modificada del sitio web www.ensembl.org).

Aunque la mayoría de las enfermedades priónicas son esporádicas cerca de un 10-15% son familiares y se deben a mutaciones en el gen de la proteína prión, a la fecha se han descrito tres tipos de mutaciones en este gen: mutaciones puntuales, inserciones de secuencias repetidas y muy raramente deleciones (Mead, 2006) **Figura 7**.

Las mutaciones puntuales corresponden al cambio de una base en el DNA que implica la sustitución de un aminoácido por otro en la proteína prión como se indican en la **tabla 2**. Las inserciones de secuencias repetidas están constituidas por la repetición en números variables (2 a 9) que codifican para un octapéptido situado en la porción del extremo N-terminal de la proteína prión entre los codones 51 y 91; teniendo una longitud variable de 96 a 216 pb (Mead, 2006).

Las deleciones que se presentan en el gen *PRNP* son raras y poco frecuentes, todas se localizan en la región que codifica para los octapéptidos repetidos y no modifican el marco de lectura abierto (ORF) (Mead, 2006) **Figura 7**.

Se han descrito cerca de 42 mutaciones diferentes, algunas asociadas con un tipo clínico particular, otras a un amplio espectro de fenotipos clínicos como se muestra en la **Tabla 2** las cuales presentan una forma de herencia autosómica dominante.

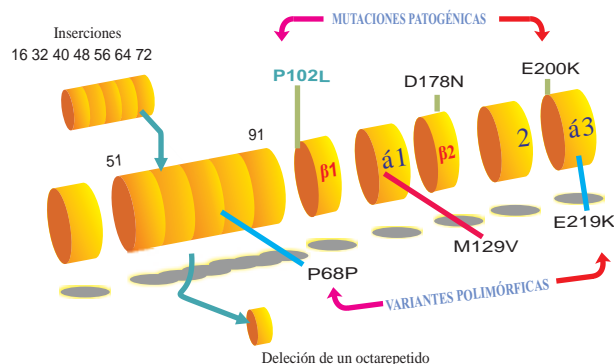


Figura 7. Esquema representativo del gen de la proteína prión *PRNP*. Se muestra el marco de lectura abierta (ORF) con las mutaciones y polimorfismos más comunes localizadas entre el codón 51 y 230.

Tabla 2. Mutaciones en el gen de la proteína prión

DNA Inicial	DNA Final	AA Inicial	AA Final	Codón	Referencia
CCT	CCC	Pro	Pro	P68P	Windl (1999) Hum Gen 105:244
CCG	CTG	Pro	Leu	P102L	Hsiao (1989) Nature 338:342
CCA	CTA	Pro	Leu	P105L	Kitamoto (1993) BBRC 191:709
CCA	ACA	Pro	Thr	P105T	Comunicación personal
GCA	GTA	Ala	Val	A117V	Doh-Ura (1989) BBRC 163:974
GCA	GCG	Ala	Ala	A117A	Hsiao (1989) Nature 338:342
GGC	GGG	Gly	Gly	G124G	Prusiner (1997) Science 278:245
ATG	GTG	Met	Val	M129V	Doh-Ura (1989) BBRC 163:974
ATCN	ATG	Ile	Met	I138M	Laplanche (2000) comunicación personal
GNGC	AGC	Gly	Ser	G142S	Laplanche (2000) comunicación personal
TAT	TAG	Tyr	stop	Y145X	Ghetti (1996) PNAS 93:744
CAA	TAA	Gln	stop	Q160X	Finckh U (2000) Am J Hum Genet 66:110
GTG	GTA?	Val	Val	V161V	Prusiner (1997) Science 278:245
AAC	AGC	Asn	Ser	N171S	Samaia (1997) Nature 390:241
AAC	AAT	Asn	Asn	N173N	Laplanche (2000) comunicación personal
CAC	CAT	His	His	H177H	Ripoll (1993) Neurology 43:1934
GAC	AAC	Asp	Asn	D178N	Goldfarb (1991) Lancet 337:425
GTC	ATC	Val	Ile	V180I	Kitamoto (1993) BBRC 191:709
ACA	GCA	Thr	Ala	T183A	Nitrini (1997) Ann Neurol 42:138
CAC	CGC	His	Arg	H187R	Cervenakova (1999) Am J Med Genet 88:653
ACG	AGG	Thr	Arg	T188R	Windl (1999) Hum Gen 105:244
ACG	AAG	Thr	Lys	T188K	Finckh U (2000) Am J Hum Genet 66:110
ACG	GAG	Thr	Ala	T188A	Collins S (2000) Arch. Neurol 57:1058
ACG	ACA	Thr	Thr	T188T	Laplanche (2000) comunicación personal
GAG	AAG	Glu	Lys	E196K	Peoc'h (2000) Human Mutation 323
TTC	TCC	Phe	Ser	F198S	Hsiao (1992) Nature Genet 1:68
GAG	AAG	Glu	Lys	E200K	Goldgaber (1989) Exp Neurol 106:204
GAC	AAC	Asp	Asn	D202N	Piccardo (1998) J N Exp Neur 57:979
GAC	GAT	Asp	Asp	D202D	Laplanche (2000) comunicación personal
GTT	ATT	Val	Ile	V203I	Peoc'h (2000) Human Mutation 323
CGC	CAG	Arg	His	R208H	Mastrianni (1996) Neurol 47:1305
CGC	CGT	Arg	Arg	R208R	Laplanche (2000) comunicación personal
GTT	ATT	Val	Ile	V210I	Pocchiari (1993) Ann. Neurol 34:802
GAG	CAG	Glu	Gln	E211Q	Peoc'h (2000) Human Mutation 323
CAG	CGG	Gln	Pro	Q212P	Piccardo (1998) J N Exp Neur 57:979
CAG	CAA	Gln	Gln	Q212Q	Windl (1999) Hum Gen 105:244
CAG	CGG	Gln	Arg	Q217R	Hsiao (1992) Nature Genet 1:68
GAG	AAG	Glu	Lys	E219K	Barbantani (1996) Neurobiology 47:734
AGA	AGG	Arg	Arg	R228R	Windl (1999) Hum Gen 105:244
TCG	TCA	Ser	Ser	S230S	Windl (1999) Hum Gen 105:244
ATG	AGG	Met	Arg	M232R	Kitamoto (1993) BBRC 191:709
CCA	TCA	Pro	Ser	P238S	Windl (1999) Hum Gen 105:244

(Tomada y modificada del sitio web www.mad-cow.org indicando un total de 42 mutaciones)

El gen *PRNP* tiene varios polimorfismos siendo los más importantes en el codón 129 y 219, estos polimorfismos pueden modular el fenotipo clínico, demostrándose que la secuencia de estos codones varía de acuerdo al origen de la población y lugar geográfico (Ahn y cols., 2006; Furukawa y cols., 1995; Bianca y cols., 2003).

El polimorfismo en el codón 129 (M129V) tiene 2 alelos, uno que codifica para el aminoácido metionina (Met-129) y otro para el aminoácido valina (Val-129); por lo que da origen a dos genotipos homocigotos (M/M y V/V) y un heterocigoto (M/V). Este polimorfismo controla muchas características de las enfermedades priónicas incluyendo la susceptibilidad, el tiempo de incubación y la barrera entre especies (Everbroeck y cols., 2001).

La determinación del polimorfismo M129V es importante porque modifica el riesgo de adquirir la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, y ha sido asociado en la susceptibilidad de las formas esporádicas, iatrogénicas y en la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (Wieser y cols., 2006).

Cuando se analizó la influencia del codón 129 sobre las características clínicas de esta enfermedad, existió una clara correlación entre las diferentes características patológicas e inicio y duración de la enfermedad como por ejemplo la homocigocidad para metionina la cual suele iniciar la enfermedad con demencia, presenta el electroencefalograma (EEG) típico observándose placas amiloides en la biopsia. Los homocigotos valina tienden a presentar inicialmente ataxia, los hallazgos EEG no son típicos y existe abundantes placas de amiloide en el cerebro (Wieser y cols., 2006).

Estudios previos reportan un incremento del riesgo de hasta 3-veces para desarrollar la enfermedad CJ en pacientes que son homocigotos M/M. En Europa (Francia, Italia y Reino Unido) predomina el genotipo heterocigoto (M/V) con una frecuencia de aproximadamente del 50%, mientras que la frecuencia de los homocigotos (M/M) es del 37 al 45% y para los homocigoto (V/V) esta frecuencia disminuye entre el 9 al 14% (Mead, 2006).

En poblaciones Asiáticas, el homocigoto M/M tiene una frecuencia del 92% en población sana japonesa, tailandesa y coreana, mientras que es muy raro el homocigoto V/V, pero el genotipo en el codón 219 afecta las características fenotípicas de las enfermedades priónicas tanto esporádicas como hereditarias en estas poblaciones (Ahn y cols., 2006).

La forma de transmisión de estas enfermedades es variable y puede deberse a inoculación o ingesta de material contaminado por priones, por ejemplo las formas esporádicas podría ser explicada por la ocurrencia de mutaciones somáticas, o por una rara conversión de la proteína prión normal a una forma anormal como ha ocurrido con el Kuru que está condicionado por el canibalismo (Tateishi y cols., 1996).

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es la más frecuente con una incidencia estimada de un caso por millón al año y con una distribución uniforme mundial. La mayoría de los casos son esporádicos (85%) y el resto formas familiares o iatrogénicas, más una nueva variante asociada a la ingesta de comida contaminada con la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), esta variante se distingue de otras enfermedades priónicas adquiridas ya que representa el único ejemplo de infección que atraviesa la barrera de especie de bovino a humanos la cual se diferencia de la forma clásica por la edad de los pacientes (media de 26 años) con periodos de sobrevivencia mas cortos y en la presentación clínica (alteraciones en el comportamiento, ataxia más que demencia) y ausencia del patrón típico del electroencefalograma (EEG) (Weiser y cols., 2006; Brown, 1998).

En los casos esporádicos se ha observado una variabilidad clínica y neuropatológica, los datos clínicos más relevantes son el deterioro mental progresivo y mioclonías con un electroencefalograma (EEG) característico. Mediante inoculación intracerebral se ha demostrado la infectividad de los extractos cerebrales de animales enfermos y se ha reportado infección accidental por inoculación de priones, a través de inyecciones de hormona de crecimiento, transplante de córnea e implantación de electrodos cerebrales (Weiser y cols., 2006).

En nuestro país no existen datos epidemiológicos, ya que la enfermedad es poco común, a la fecha se han identificado casos con la enfermedad de CJ esporádicos, principalmente en pacientes femeninas de Guadalajara, Jalisco, Ciudad de México y un solo caso del sexo masculino proveniente de Saltillo, Coahuila. Todos ellos presentaron cuadros de demencia rápidamente progresiva asociada a síndrome cerebeloso, mioclonías, movimientos anormales, disfunción motora con pruebas de laboratorio positivo para la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob de los cuales 4 casos fueron confirmados por biopsia cerebral después de la muerte (Reyes y cols., 2002; Martínez y cols., 1995; Calderón y cols., 2001; Barroso y cols., 1980).

5 DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

En la actualidad, el diagnóstico pre-mortem de las enfermedades priónicas se realiza mediante el diagnóstico clínico y la detección de la proteína 14-3-3 en líquido cefalorraquídeo lo que da lugar a un diagnóstico *probable*, mientras que para tener un diagnóstico *definitivo*, es necesario que se cumplan al menos los siguientes criterios: transmisión a animales, presencia de PrP, o mutaciones en el gen *PRNP*, siendo necesario la confirmación histopatológica para pasar de *probable a definitivo*; por lo cual es recomendable realizar la necropsia en aquellos casos en que se sospecha de enfermedades priónicas (Takahashi y cols., 1999; Lemstra y cols., 2000).

La detección de la proteína PrP es un marcador de diagnóstico fiable de las enfermedades priónicas. Puede ser detectada mediante técnicas de western blot, histoblot y microscopía electrónica, pero tienen el inconveniente de que requieren material fresco, lo cual disminuye su uso debido a la capacidad infectiva de la proteína prión. Otra posibilidad, es la detección mediante técnicas de inmunohistoquímica realizadas sobre material fijado en formol y embebido en parafina, al que previamente se ha realizado un paso con ácido fórmico para anular la infectividad (Lemstra y cols., 2000; Watts y cols., 2006).

Las lesiones histopatológicas presentes en estas enfermedades se restringen principalmente al sistema nervioso central, siendo comunes para todas las especies e incluyen la degeneración neuronal con presencia de vacuolas en neuronas de la sustancia gris, lo que da el aspecto esponjiforme al parénquima afectado, la hipertrofia, proliferación de astrocitos y la presencia de placas amiloides, que varía en su localización y abundancia en las distintas encefalopatías (Prusiner, 2001; Kretzschmar, 2003).

Dentro de las lesiones histopatológicas de las enfermedades priónicas se han identificado tres tipos de patrones de tinción: a) perivacuolar b) en forma de placas de amiloide-PrP, y c) difuso-sináptico **Figura 8**.

a) Patrón perivacuolar: Consiste en depósitos de PrP que se observan en aquellos casos con severo aspecto esponjiforme, localizándose entre las vacuolas y la periferia de estas lesiones, mientras que si el tamaño de las vacuolas es pequeño (microcísticas), la expresión de la PrP puede ser negativa (Figura. 8a) (Prusiner, 2001).

b) Patrón de placas de amiloide-PrP: La morfología de estas placas se define como placas tipo Kuru o floridas, en forma de depósitos grandes de aspecto irregular multi o unicéntricas y los sitios más frecuentes de localización son en el cerebelo concretamente en la capa granular (aunque su proporción varían según el tipo de enfermedad). (Figura 8b) (Prusiner, 2001).

c) Patrón difuso-sináptico: Consiste en una tinción granular de la sustancia gris en la corteza cerebelar donde se observan depósitos en la capa granular, su localización y tamaño sugieren que son componentes de los glomérulos del cerebelo. (Figura. 8c) (Prusiner, 2001).

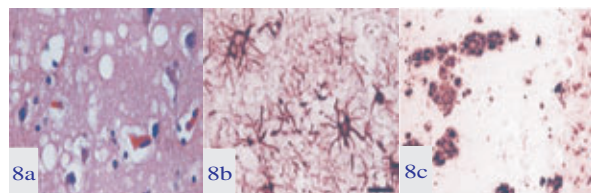


Figura 8. Histopatología de las placas formadas en los diferentes patrones de tinción. La imagen 8a muestra el aspecto esponjiforme característico de la enfermedad por priones; mientras que en la imagen 8b muestra un patrón característico de placas amiloides-PrP y en 8c se observan los depósitos granulares en la corteza cerebelar. Tomada y modificada de Prusiner, 2001).

El tratamiento actual de este tipo de enfermedades tiene como propósito aliviar los síntomas, ya que no existe terapia alguna que detenga el proceso de la enfermedad ya una vez instalada. A través de las diferentes investigaciones se han sometido a pruebas diferentes compuestos químicos, entre ellos la amantadina, la quinacrina, el rojo congo, los esteroides, el interferón, los agentes antivirales y los antibióticos. No obstante, ninguno de estos tratamientos ha demostrado un beneficio uniforme, por lo que el manejo debe ir encaminado a prevenir las complicaciones asociadas a un rápido deterioro neurológico (Yung y cols., 2004; Barret y cols., 2003).

II. JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN



En el departamento de Neurogenética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se realizó en 1998 el diagnóstico clínico de una familia mexicana con probable enfermedad por priones, el diagnóstico fue confirmado mediante el análisis molecular del caso índice y de 23 individuos en riesgo, cuyas muestras de DNA fueron analizadas en la Universidad de Indiana USA, encontrándose una mutación en el codón 102 donde existe el cambio del nucleótido citosina por timina (Alonso y cols., 1998) pero no se analizó con que polimorfismo estaba acoplada la mutación.

Esta familia actualmente consta de 6 generaciones y de 150 individuos en riesgo, por lo que el departamento de Neurogenética se propuso implementar el diagnóstico molecular del gen de la proteína prión y determinar con que polimorfismo está acoplada la mutación para dar un diagnóstico de certeza a nuevos familiares afectados y a otros pacientes con la misma patología.

Así mismo este estudio pretende ofrecer el diagnóstico molecular de las formas hereditarias en individuos con riesgo de haber heredado la enfermedad, mediante el análisis de las mutaciones en el gen de la proteína prión, la cual es responsable de las enfermedades priónicas. Esto es de suma importancia ya que abre la posibilidad del diagnóstico preciso así como dar asesoría genética a las familias con esta enfermedad.

La determinación de los genotipos del polimorfismo en el codón 129 en población normal nos permitirá realizar una estimación de la frecuencia en la población mexicana la cual no se conoce y estimar si este polimorfismo participa como un factor de riesgo para desarrollar enfermedades priónicas permitiendo conocer la segregación del mismo en la muestra estudiada.



III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

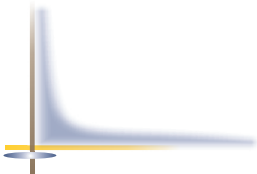


HIPÓTESIS

- Los pacientes diagnosticados clínicamente con la enfermedad por priones, tendrán mutaciones acopladas a diferentes polimorfismos en el codón 129 del gen *PRNP* de la proteína prión que permiten se manifieste la enfermedad.

OBJETIVOS

- Determinar la mutación en el gen *PRNP* de la proteína prión en pacientes mexicanos con probable diagnóstico clínico de enfermedades por priones.
- Determinar la frecuencia del polimorfismo M129V en un grupo control sano y en pacientes con probable enfermedades por priones.
- Analizar si el polimorfismo M129V es un factor de riesgo en pacientes con probable enfermedad por priones.



III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

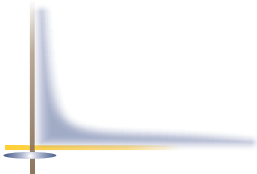


HIPÓTESIS

- Los pacientes diagnosticados clínicamente con la enfermedad por priones, tendrán mutaciones acopladas a diferentes polimorfismos en el codón 129 del gen *PRNP* de la proteína prión que permiten se manifieste la enfermedad.

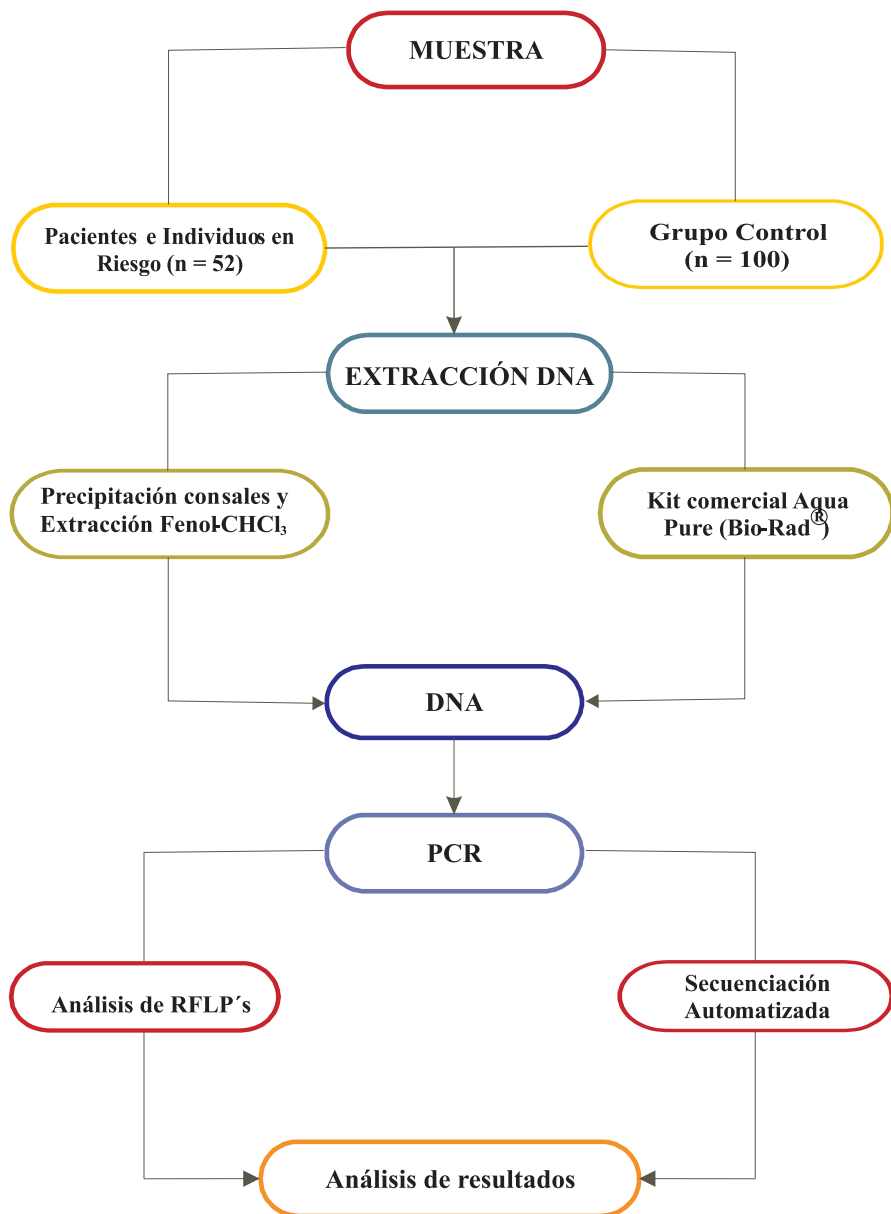
OBJETIVOS

- Determinar la mutación en el gen *PRNP* de la proteína prión en pacientes mexicanos con probable diagnóstico clínico de enfermedades por priones.
- Determinar la frecuencia del polimorfismo M129V en un grupo control sano y en pacientes con probable enfermedades por priones.
- Analizar si el polimorfismo M129V es un factor de riesgo en pacientes con probable enfermedad por priones.



IV. METODOLOGÍA

1 Diagrama de flujo



2 Muestras biológicas

2.1.-PACIENTES E INDIVIDUOS EN RIESGO

Se analizaron 4 pacientes y 39 individuos en riesgo de una familia con enfermedad de GSS, y 9 pacientes con probable enfermedad por priones que aceptaron participar en el estudio; 25 mujeres y 27 hombres de edad promedio de 33 ± 8 años; intervalo entre 4 y 77 años de edad como se muestra en la **tabla 3**.

Criterios de inclusión

- Individuos con probable enfermedad familiar o esporádicos que cumplen los criterios clínicos de la enfermedad.
- Individuos en riesgo que aceptaron participar en el estudio.

Criterios de exclusión

- Pacientes con diagnóstico confirmado de Ataxia Espinocerebelosa, Parkinson, enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurológicas.

2.2.- GRUPO CONTROL

Se analizaron 100 individuos sanos no relacionados entre sí ni con los pacientes que aceptaron participar en el estudio, 50 mujeres y 50 hombres, de edad promedio de 46 ± 2.5 años; intervalo entre 31 y 62 años de edad como se muestra en la **tabla 3**.

Criterios de inclusión

- Sin antecedentes familiares de enfermedades neurológicas.
- Con antecedentes de dos generaciones de padres mexicanos.

Tabla 3. Característica de las muestras estudiadas.

	Género	N	Intervalo de edad	Edad promedio
Pacientes	Femenino	25	4-76	31.7 ± 7.8
e individuos en riesgo	Masculino	27	8-77	34.3 ± 8.0
(n = 52)				
Grupo control	Femenino	50	30-61	45.7 ± 2.44
(n = 100)	Masculino	50	31-62	47.2 ± 2.41

3 Toma de muestra

Para el análisis de DNA, se tomó una muestra de sangre periférica con anticoagulante de ácido cítrico-dextrosa a los pacientes e individuos en riesgo que aceptaron participar en el estudio y el grupo control, empleando el sistema de vacío vacutainer, previo consentimiento informado.

4.- Extracción de DNA por precipitación con sales y extracción con fenol-cloroformo (Sambrook y cols., 2001)

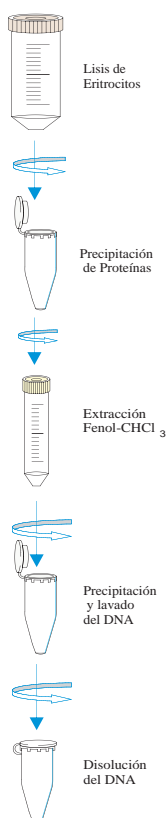


Figura 9. Esquema de la extracción de DNA por la técnica de precipitación con sales y extracción con fenol-cloroformo

El DNA se extrajo a partir de una alícuota de 5mL de sangre periférica. La lisis de las células rojas se realizó mediante la adición de 35 mL de una solución de lisis de células rojas (Tris 1 M pH 7.6, MgCl₂ 1 M, NaCl 5 M) se homogenizó y centrifugó a 5,000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se decantó y se repitió el procedimiento hasta obtener un botón de leucocitos libre de hemoglobina.

La lisis del botón de leucocitos se realizó mediante la adición de 886 µL de NaCl (5 mM), mas 46 µL de SDS (10%) y 308 µL de NaCl (7 M) se homogenizó y centrifugó a 11,000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C.

El sobrenadante se transfirió a un tubo falcon adicionando 3 mL de la mezcla Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1). Se mezcló y centrifugó, posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo falcon y se adicionó 3 mL de la mezcla Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1), todos los pasos de centrifugación fueron a 7,000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo falcon y se adicionó 3 mL de alcohol isopropílico frío al 100%. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 7,000 r.p.m. por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se eliminó el etanol residual utilizando un concentrador de vacío. El DNA obtenido se resuspendió en 500 µL de agua estéril y se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización **Figura 9**.

5 Obtención de DNA por medio del Kit Comercial Aqua-Pure Bio-Rad®

El DNA se extrajo a partir de una alícuota de 500 μL de sangre periférica utilizando el kit Aqua Pure de la marca Bio-Rad®.

La lisis de las células rojas se realizó por la adición de 900 μL de la solución de lisis de células rojas (RBCL Solution). Se incubó a 37 °C por 10 minutos.

Después de la incubación se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y al botón de leucocitos se le adicionó 300 μL de una solución de lisis (Genomic DNA Lysis Solution), se incubó a 37°C por 30 minutos.

Posteriormente se le adicionó al homogenizado 100 μL de la solución de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution) se homogenizó por 30 segundos y centrifugó a 16,000 g por 1 minuto.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf y se le adicionó 500 μL de isopropanol frío al 100%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 16,000 g por 1 minuto.

Se decantó el sobrenadante y se eliminó el etanol residual utilizando el concentrador de vacío. El DNA se resuspendió en 200 μL de solución de hidratación (DNA Hidratation Solution) y se almacenó a -20 °C hasta su utilización **Figura 10**.

Después de que se obtuvieron las muestras de DNA, se analizaron por medio de un corrimiento electroforético utilizando geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para verificar la integridad, la pureza y estimar la concentración del DNA, mediante la fluorescencia de las bandas.

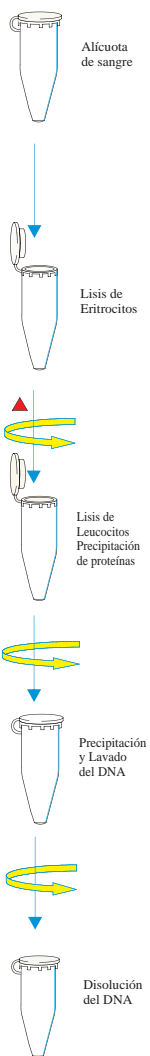


Figura 10. Esquema de la extracción de DNA por la técnica del kit comercial Aqua-Pure

6 Amplificación del fragmento de 738 pb y 452 pb

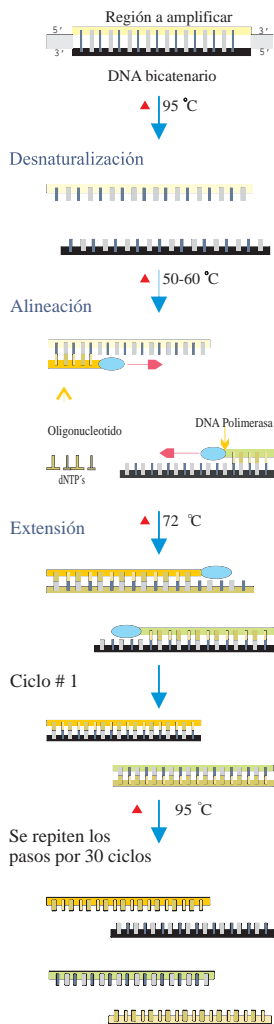


Figura 11. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se establecieron las condiciones empleando los oligonucleótidos 5'-gatgctggttctcttggg y 5'-cccactatcaggaagatgag que flanquean el gen *PRNP* que incluye el codón 102 y 129, descritos por Furukawa y cols., en 1995, los cuales generan un producto de 738 pb el cual se empleó para el análisis de RFLP's, así como los oligonucleótidos 5'-gatgctggttctcttggg y 5'-ggtaacggtgc atgttttcacg que permiten flanquear un fragmento de 452 pb, el cual se empleó para la reacción de secuenciación.

Para la reacción de amplificación se usaron 50 ng de DNA, 10 nmol/ μ L de cada uno de los oligonucleótidos, 10 μ L de Master Mix DNA polimerasa™ (Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP), en un volumen final de 30 μ L.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystem 9700 (PE Biosystem®) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C por 10 min y 30 ciclos a 94 °C, 60 seg, 56-60 °C, 60 seg y 72 °C, 2 min (Elles y cols., 2004) **Figura 11.**

Los productos amplificados fueron resueltos en un gel de agarosa al 2.5% incorporando previamente al gel bromuro de etidio (10 μ g/mL). La electroforésis se llevó a voltaje constante (100 V) por 30 minutos, el gel se flanqueó con un marcador de DNA de peso molecular (marcador VIII Roche). Y finalmente fueron analizados en un transiluminador con luz UV.

7 RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA

7.1.- Enzima de restricción Dde I (*Desulfovibrio desulfuricans*)

Los fragmentos de 738 pb fueron digeridos con la enzima de restricción Dde I utilizando 10 μ L del producto amplificado de 738 pb, 3 U/ μ L de la enzima de restricción Dde I (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 μ g/mL BSA y 50% glicerol) y 2 μ L del amortiguador para la enzima de restricción 10 X (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) llevando la reacción a un volumen final de 25 μ L e incubando en un termomixer (Eppendorf®) a 37 °C por 16 horas.

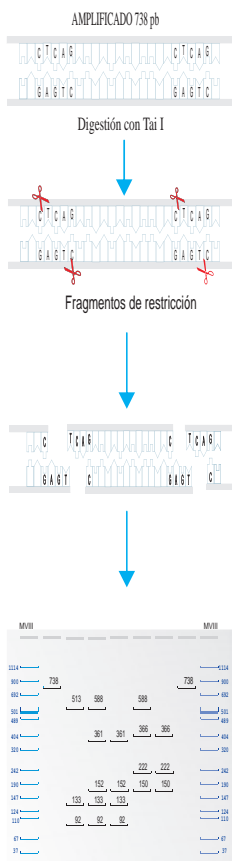


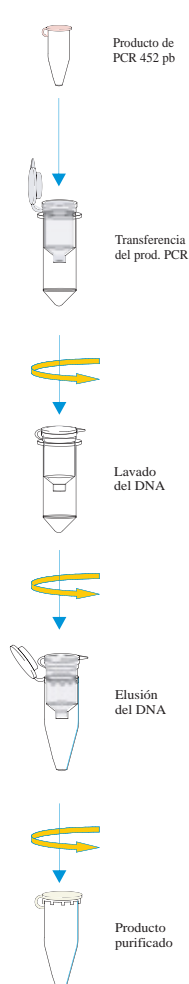
Figura 12. Esquema de la representación del corte con las enzimas de restricción Dde I y Tai I

7.2.- Enzima de restricción Tai I (*Thermus aquaticus*)

La reacción de digestión se realizó empleando: 10 μ L del producto amplificado de 738 pb, 3 U/ μ L de la enzima de restricción Tai I (10 mM Tris-HCl pH 7.4 a 25 °C, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA y 50% glicerol) y 2 μ L del amortiguador 10 X (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA) se llevo la reacción a un volumen final de 25 μ L y se incubó en un termomixer (Eppendorf®) a 65 °C por 2 horas.

Los productos digeridos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 6% no desnaturizante durante 2 ½ horas a 200 V. El gel se flanqueó con un producto sin digerir de 738 pb y con un marcador de peso molecular (marcador VIII Roche®). El gel de poliacrilamida se tiñó en una solución de bromuro de etidio (10 μ g/mL) durante 10 minutos y los fragmentos de restricción generados con la enzima de restricción se identificaron en un transiluminador de luz UV **Figura 12**.

8 Purificación del producto de 452 pb obtenido en PCR utilizando el Kit comercial QIA-quick (QIAGEN®)



Se realizó la purificación del producto de PCR de 452 pb empleando el kit de purificación Qiagen®, de acuerdo a la metodología descrita por el proveedor.

Se adicionaron 5 volúmenes del amortiguador PB (Binding Buffer) por 1 volumen del producto de PCR, se homogenizó y transfirió a una columna QIA-quick con tubo colector, se centrifugó a 13,000 r.p.m por 1 minuto y se decantó el sobrenadante del tubo colector.

Se adicionó 750 μ L del amortiguador PE (Wash Buffer) y se centrifugó a 13,000 r.p.m por un 1 minuto, se decantó el sobrenadante del tubo colector y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones.

Se colocó la columna en un tubo eppendorf y se adicionó 20 μ L del amortiguador de elución EB (Elution Buffer) en el centro de la membrana y se centrifugó a 13,000 r.p.m por 1 minuto **Figura 13**.

Se verificó la integridad y cantidad del producto de PCR purificado en un gel de agarosa al 2.5% con bromuro de etidio (10 μ g/mL) previamente incorporado. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 V) por 30 minutos. Los geles fueron flanqueados con un marcador de peso molecular conocido (marcador VIII Roche®). Y finalmente fueron analizados en un transiluminador con luz UV.

Figura 13. Esquema de la purificación de los productos de PCR mediante el kit comercial QIA-quick

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Las muestras de sangre periférica del caso índice e individuos en riesgo que aceptaron participar en el estudio así como de aquellos pacientes con probable diagnóstico de enfermedad por priones, fueron tomadas por un equipo medico especializado del instituto, siguiendo las guías publicadas por la Organización Mundial de la Salud, para prevenir posibles contaminaciones por el material biológico infectado.

Las muestras de los individuos del grupo control fueron tomadas de acuerdo a los protocolos de toma de muestra del instituto previo consentimiento informado para ambos grupos.

Para la toma de muestra se trató de recolectar un volumen de 10 mL de sangre periférica, sin embargo en algunos casos por edad, características anatómicas y fisiológicas de los individuos enfermos sólo se obtuvieron un volumen aproximado de 1 mL.

De la sangre periférica se obtuvo DNA por dos métodos, el método del kit comercial Aqua-Pure que proporciona un método sencillo para la rápida purificación a partir de un volumen de sangre periférica de 300 μ L y el método de extracción con fenol-cloroforno que ofrece una amplia gama de aplicaciones, escalabilidad y bajo coste permitiendo aislar DNA a partir de un volumen de 5 mL.

Se comprobó la pureza y la integridad del DNA obtenidos por medio de un corrimiento electroforético utilizando geles de agarosa al 1% donde se observa en la **figura 16** la compactación y la distancia de migración del DNA.

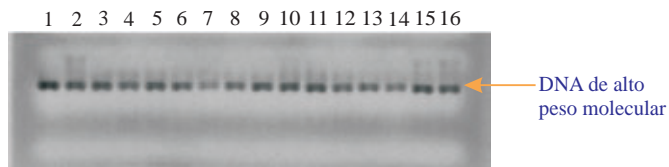


Figura 16. Gel de agarosa al 1%. Carril 1 al 16 muestras la extracción de DNA de alto peso molecular, pureza e integridad por las dos técnicas empleadas.

El DNA de las muestras de pacientes e individuos en riesgo, así como al grupo control se les amplificó un fragmento del gen *PRNP* por PCR empleando los oligonucleótidos que flanquean el marco de lectura abierta, que incluye el codón 102 y 129 los cuales generan un producto de 452 pb y otro de 738 pb como se muestran en las **figuras 17 y 18** en donde observamos las bandas de DNA con altos rendimientos que fueron comparados con el marcador de peso molecular VIII para deducir el tamaño aproximado de las mismas obteniéndose el amplificado deseado y no observándose otros amplificados.

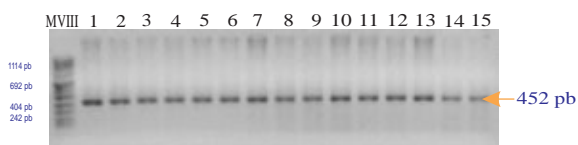


Figura 17. Gel de agarosa al 2.5% de los productos de amplificación por PCR de 452 pb. Carril 1 marcador de peso molecular VIII, carriles 2 al 15 productos de PCR.

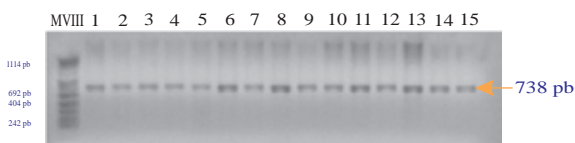


Figura 18. Gel de agarosa al 2.5% de los productos de amplificación por PCR de 738 pb. Carril 1 marcador de peso molecular VIII, carriles 2 al 15 productos de PCR.

Al producto de PCR de 738 pb de las muestras de pacientes e individuos en riesgo se le hizo el análisis de digestión enzimática para determinar la mutación en el codón 102 (P102L). Se observan en la **figura 19** los productos digeridos con la enzima de restricción Dde I la cual reconoce el sitio palindrómico 5'...C?TNAG...3' y genera 3 fragmentos de 513 pb, 133 pb y 92 pb en los carriles 3 y 5, 9 al 12 y 14 al 16 de individuos sanos; cuando existe la mutación se genera un nuevo sitio de restricción que produce 2 nuevos fragmentos uno de 361 pb y otro de 152 pb a partir del fragmento de 513pb dando así un total de 4 fragmentos de 361 pb, 152 pb, 133 pb y 92 pb como se ve en los carriles 4, 6 al 8 y 13.

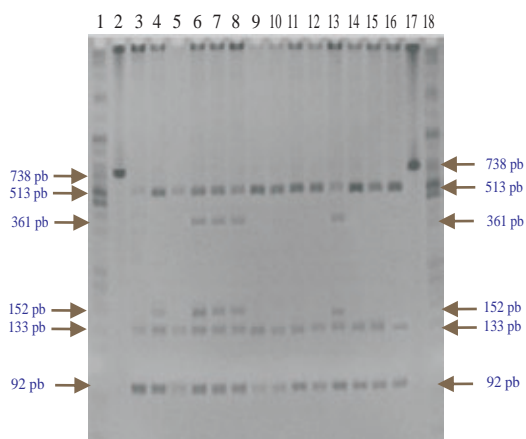


Figura 19. Gel de poliacrilamida al 6% que muestra los productos digeridos con la enzima de restricción Dde I. Carriles 1 y 18 marcador de peso molecular, carriles 2 y 17 producto de PCR no digerido (738pb), carriles 3, 5, 9-12, 14-16 muestras individuos homocigotos para el alelo prolina (P/P) generando los fragmentos 513, 133 y 92 pb. La presencia de la mutación genera un nuevo sitio de restricción y se observa en los carriles 4, 6-8 y 13 en individuos heterocigotos (P/L) que presentaron en uno de los alelos el aminoácido leucina generando los fragmentos 513, 361, 152, 133 y 92 pb.

Al analizar los fragmentos y de acuerdo a la [tabla 4](#) se pueden identificar individuos homocigotos para el aminoácido prolina (P/P) o leucina (L/L), así como individuos heterocigotos prolina/leucina (P/L).

Tabla 4. Fragmentos generados con la enzima de restricción Dde I para identificar individuos con la mutación P102L.

Homocigotos Normal	Heterocigotos Normal/Mutado	Homocigotos Mutado
513 pb	513 pb	
	361 pb	361 pb
	152 pb	152 pb
133 pb	133 pb	133 pb
92 pb	92 pb	92 pb

Para confirmar los resultados obtenidos fue necesario realizar un análisis por secuenciación del amplificado de 452 pb al cual se le hizo un paso de purificación, y así determinar con exactitud el sitio de mutación y descartar mutaciones no detectadas por RFLP's.

Los electroferogramas de las **figuras 20** y **21** confirman los resultados de aquellos individuos homocigotos para el aminoácido prolina (P/P) e individuos heterocigotos (P/L), no encontrándose individuos homocigotos para el aminoácido leucina (L/L).

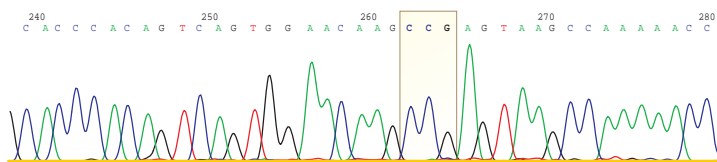


Figura 20. Electroferograma de un individuo homocigoto prolina (P/P) en el recuadro se indica el codón normal

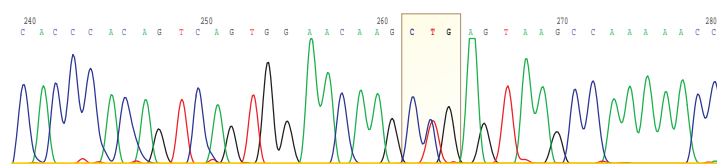


Figura 21. Electroferograma de un individuo heterocigoto prolina leucina (P/L) en el recuadro se indica el codón para la mutación P102L donde existe el cambio del nucleótido citosina por timina (C-T).

El análisis de restricción más el análisis de los electroferogramas nos permitieron identificar la mutación P102L en 4 pacientes y 7 individuos en riesgo de la familia en el gen *PRNP* donde existe una transversión de una citosina por timina (C? T) la cual modifica la secuencia de la proteína al cambiar el aminoácido prolina por leucina en aquellos individuos con la mutación.

Previamente se había reportado la mutación P102L en una familia australiana y más de 50 familias en el resto del mundo, esta mutación se hereda en forma autosómica dominante y el fenotipo clínico de la enfermedad se observan los cambios neuropatológicos donde predominan las placas amiloides y los cambios esponjiformes en el cerebelo de los individuos afectados (Woulfe y cols., 2005).

Para hacer el análisis de las frecuencias genotípicas del polimorfismo en el codón 129 (M129V) del gen *PRNP* se emplearon las muestras de DNA de pacientes e individuos en riesgo y del grupo control.

Se utilizó el fragmento de 738 pb para la digestión enzimática empleando la enzima de restricción *Tai* I la cual reconoce el sitio palindrómico 5'...ACGT?...3' generando 2 fragmentos uno de 588 pb y otro de 150 pb como se observa en los carriles 2 y 11 en individuos homocigotos para el aminoácido metionina (M/M). El fragmento de 588 pb genera un nuevo sitio de restricción dando un total de 3 fragmentos 366 pb, 222 pb y 150 pb como se ve en los carriles 4 y 8 para aquellos individuos homocigotos para el aminoácido valina (V/V) y la combinación de los fragmentos de 588 pb, 366 pb, 222 pb y 150 pb para individuos heterocigotos para los aminoácidos metionina-valina (M/V) como se observa en los carriles 3, 5, 7, 9, 10, 12 y 13 de la **figura 22** y en el resumen de la **tabla 5**.

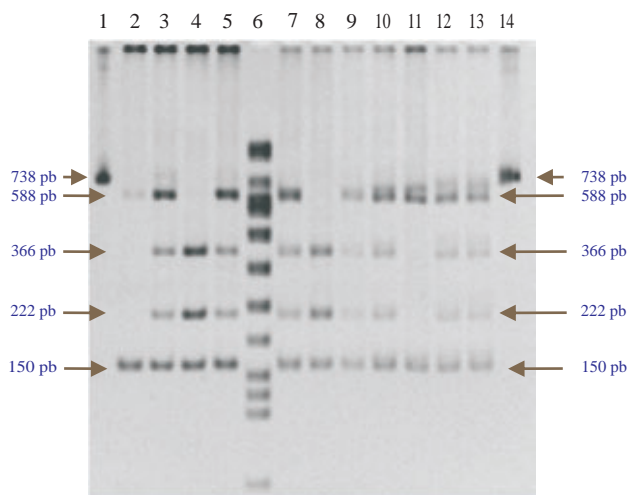


Figura 22. Gel de poliacrilamida al 6% que muestra los productos digeridos con la enzima de restricción *Tai* I.

Carril 1 y 14 producto no digerido de 738 pb, carril 6 marcador de peso molecular, carril 2 y 11 muestra los fragmentos generados de 588 y 150 pb para un individuo homocigoto metionina (M/M), carril 3, 5, 7, 9, 10, 12 y 13 muestras los fragmentos generados de 588, 366, 222 y 150 pb para individuos heterocigotos (M/V), carril 4 y 8, individuos homocigotos para el aminoácido valina (V/V) los cuales generan los fragmentos de 366, 222 y 150.

Tabla 5. Fragmentos generados con la enzima Tai I para identificar el polimorfismo M129V

Homocigotos Para Metionina (M/M)	Heterocigotos Para Metionina-Valina (M/V)	Homocigotos Para Valina (V/V)
588 pb	588 pb	
	366 pb	366 pb
	222 pb	222 pb
150 pb	150 pb	150 pb

La confirmación de nuestros resultados de PCR-RFLP's se realizó mediante la secuenciación del fragmento purificado de 452 pb. Las **figuras 23, 24, 25** muestran la secuencia de los electroferogramas del polimorfismo en el codón 129 de aquellos individuos homocigotos para el aminoácido metionina (M/M) y el homocigoto valina (V/V) donde se observa el cambio de una transición del nucleótido adenina por guanina (A? G) y una doble banda en el individuo heterocigoto metionina-valina (M/V).

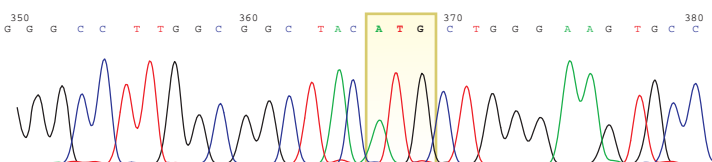


Figura 23. Electroferograma de un individuo homocigoto para el aminoácido metionina (M/M).

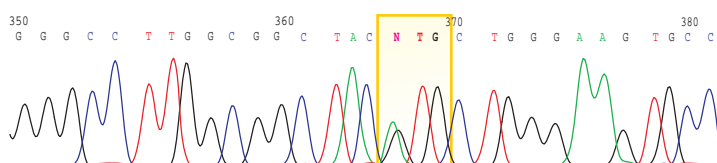


Figura 24. Electroferograma de un individuo heterocigoto para el aminoácido metionina-valina (M/V).

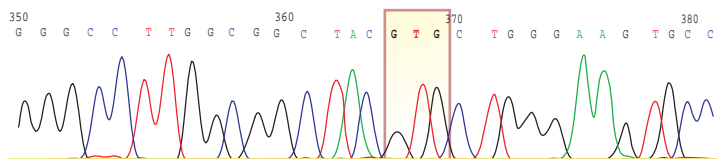


Figura 25. Electroferograma de un individuo homocigoto para el aminoácido valina (V/V).

Se determinó así la frecuencia genotípica del polimorfismo M129V encontrándose un promedio del 37%, 51% y 12% para el genotipo M/M, M/V y V/V respectivamente en individuos del grupo control, así como un promedio de 23% M/M 54% M/V y 23% V/V en pacientes e individuos con la mutación e individuos en riesgo como se muestra en la **tabla 6**.

Tabla 6. Distribución del genotipo M129V y la frecuencia del alelo metionina en la muestra estudiada

	N	GENOTIPOS			Frecuencia Alelo Met	Frecuencia Alelo Val
		MM %	MV %	VV %		
Pacientes + Individuos con la mutación	11	45.5	54.5	0	0.73	0.27
Individuos en riesgo	41	17.1	53.6	29.3	0.44	0.56
Grupo control	100	37	51	12	0.625	0.375

La frecuencia para el alelo metionina en el grupo control se calculó con la ecuación de Hardy-Weinberg y fue de 0.625 mostrando similitud a las reportadas en poblaciones como Alemania 0.620, Grecia 0.636, España 0.653 entre otras que pertenecen a la región europea, no así con las poblaciones asiáticas (Geldermann y cols., 2006; Scholz y cols., 2005; Martorell y cols., 2006; Jeong y cols., 2005). Con respecto a la frecuencia del alelo valina en otras poblaciones y la muestra estudiada se encontró una baja frecuencia de este genotipo igual que en las poblaciones europeas como se muestra en la **tabla 7**.

La enfermedad de GSS esta ligada al polimorfismo en el codón 129 que puede influir en el fenotipo del padecimiento, esta asociación fenotipo-genotipo muestra una heterogeneidad en la presentación de la sintomatología en individuos afectados como por ejemplo la homocigocidad para el alelo metionina, el inicio de la enfermedad es con ataxia más que demencia, estudios previos asocian al alelo metionina y el genotipo M/M con la enfermedad de CJD; cuando se analiza el polimorfismo del codon 129 existen diferencias en características patológicas, edad de inicio y duración de la enfermedad.



Tabla 7. Frecuencia del polimorfismo M129V en diferentes poblaciones estudiadas

País	N	GENOTIPOS			Het %	Frec. Alelo M	Referencia
		MM	MV	VV			
Finlandia	133	56	65	10	48.9	0.665	Scholz y cols., 2005
Grecia	125	55	49	21	39.2	0.636	
EU	142	70	52	20	36.6	0.676	
Italia	318	140	150	28	47.2	0.676	Del Bo y cols., 2006
Alemania	46	15	27	4	58.7	0.620	Geldermann y cols 2006
Francia	1374	606	639	129	46.5	0.674	Lucotte y cols., 2005
6 regiones							
España	502	214	228	60	45.4	0.653	Martorell y cols., 2007
Italia	272	139	113	20	41.5	0.718	Labatte y cols., 2007
Corea	529	449	29	1	5.5	0.971	Jeong y cols., 2005
México	100	37	51	12	51	0.625	Este estudio

Se realizó el análisis de segregación en 4 generaciones (4 pacientes y 39 individuos en riesgo de un total de 150 individuos) para la mutación P102L y el polimorfismo M129V en la familia estudiada mediante una genealogía observándose en la **figura 26** que el alelo metionina ésta acoplado a la mutación, ya que todos los individuos afectados, así como los individuos en riesgo lo portan. En cuanto a la relación genotipo-fenotipo no muestra diferencia con otros casos documentados en la literatura.

La forma de herencia observada en el árbol genealógico es autosómica dominante ya que los pacientes de esta familia heterocigotos para la mutación P102L tienen acoplados el alelo metionina, observándose mas de un miembro afectado en las generaciones posteriores, al igual que otros miembros de esta familia los cuales heredan el polimorfismo del alelo metionina que es un factor de riesgo para esta enfermedad.



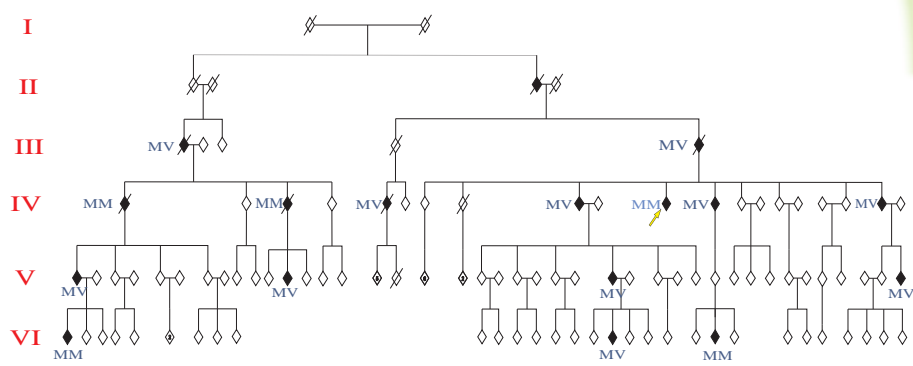
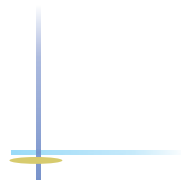


Figura 26. Análisis de segregación en la familia estudiada. Árbol genealógico que muestra la segregación de la mutación en la familia. Solo se indican aquellos pacientes e individuos con la mutación por ser los más importantes para determinar la segregación. La simbología utilizada es de rombo para la confidencialidad de los individuos en estudio, el rombo en negro con la diagonal indica individuo afectado que ha fallecido, el rombo con la diagonal indica individuo fallecido y el número en el rombo indica número de individuos o hijos.

A pesar de que las enfermedades priónicas son muy raras siguen siendo un enigma para la biología por su peculiar característica de ser hereditarias, transmisibles y esporádicas, y de los múltiples estudios realizados a la fecha y que dos investigadores Gajdusek (1976) y Prusiner (1997) han recibido el premio Nóbel por sus investigaciones sobre este tema, todavía desconocemos el mecanismo exacto por el cual la proteína prión anormal induce la formación de la proteína prión normal.

En nuestro país no hay estudios que determinen los diferentes genotipos del polimorfismo en el codón 129 y mutaciones en el gen de la proteína prión, por lo que constituye una aportación importante para el diagnóstico de estas enfermedades, y pueda ofrecer como una prueba diagnóstica en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

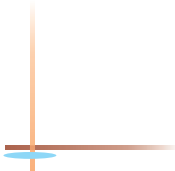


VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES



- Se identificó la mutación P102L en el gen *PRNP* de la proteína prión en 11 de 52 individuos de la familia en estudio no es una mutación nueva y se encuentra reportada y condiciona a la enfermedad de GSS.
- Se determinó la frecuencia del polimorfismo M129V del gen de *PRNP* en una muestra de la población mexicana mestiza con una heterocigocidad del 53% similar a las reportadas en otras poblaciones.
- Se confirma mediante la segregación del polimorfismo M129V en 4 generaciones que el alelo metionina está acoplado a la mutación P102L por lo cual se considera como un factor de riesgo que permite que se manifieste la enfermedad de Gerstmann Straüssler Scheinker en esta familia.



VII. BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Aguzzi, A. y Heppner F.L. 2000. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ* 7:889-902.

Aguzzi, A. y Heikenwalder, M. 2006. Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nature* 4:765-775.

Ahn, K., Kim, E., Kwon, Y-A., Kim, D. K., Lee, J-E. y Jo, S. A. 2006. No association of prion protein gene polymorphisms with Alzheimer's disease in Korean population. *Exp Mol Med* 38 (6):727-731.

Alonso, E., Piccardo, P., Young, K., Suastegui, R., Ochoa, A., Guerrero, J., Romero, V., Ghetti, B. y Mena, R. 1998. Estudio clínico, neuropatológico y molecular de una familia con enfermedad de Gerstmann Straüssler Scheinker P102L. *Arch. Inst. Nac. Neurol Neurocir.*3:12-13.

Barret, A., Tagliavini, F., Forloni, G., Bate, C., Salmona, M., Colombo, L., De Luigi, A., Limido, L., Suardi, S., Rossi, G., Auvré, F., Adjou, K. T., Sales, N., Williams, A., Lasmézas, C. y Deslys, JP. 2003. Evaluation of quinacrine treatment for prion disease. *J Virology* 77 (15):8462-8469.

Barroso, N. S. y Lombardo, L. 1980. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (C-J). *Neurol Neurocir Psiquiatr.* 21:26-33.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. y Weissmann, C. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-428.

Bianca, M., Bianca, S., Vecchio, I., Raffaele, R., Ingegnosi, C. y Nicoletti, F. 2003. Gerstmann-Straüssler Scheinker disease with P102L-V129 mutation: a case with psychiatric manifestations at onset. *Ann Genet* 46 (4):467-469.

Brown, P. y Bradley, R. 1998. 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *BMJ* 317:1688-1692.



Calderón, G. A. L., Sagastegui, R. J. A., Canales, I. C. y Fariás, G. R. 2001. Un caso de Creutzfeldt-Jakob en el noreste de México y revisión de conceptos actuales sobre enfermedad por priones. *Gac Méd Méx* 137(6):589-594.

Chesebro, B, Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L. y Keith, J. M. 1985. Identification of scrapie prion protein specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315:331-333.

Chesebro, B. 2002. Grand ideas floating freely. Conference on the new prion biology: basic science, diagnosis and therapy. *EMBO J* 3 (12):1123-1126.

Concepcion, G. P. y Padlan, E. A. 2005. The codon for the methionine at position 129 (M129) in the human prion protein provides an alternative initiation site for translation and renders individuals homozygous for M129 more susceptible to prion disease. *Med Hypotheses* 65:865-867.

Creutzfeldt, HG. 1920. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschr ges Neurol Psychiat* 57:1-19.

De Armond, S. J. y Bouzamondo, E. 2002. Fundamentals of prion biology and diseases. *Toxicology* 181-182:9-16.

Del Bo, R., Scarlato, M., Ghezzi, S., Martinelli-Boneschi, F., Fenoglio, C., Galimberti, G., Galbiati, S., Vrigilio, R., Galimberti, D., Ferrarese, C., Scarpini, E., Bresolin, N. y Pietro-Comi, G. 2006. Is M129V of *PRNP* gene associated with Alzheimer's disease? A case-control study and a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 27:770e1-770e5.

Diener, T. O., Mckinley, M. P. y Prusiner, S. B. 1982. Viroids and prions. *Proc Natl Acad Sci USA*; 79:5220-5224.

Everbroeck, B. V., Croes, E. A., Pals, P., Dermaut, B., Jansen, G., Duijn, C. M. Cruts, M., Broeckhoven C. V., Martin, J. J. y Cras, P. 2001. Influence of the prion protein and the apolipoprotein E genotype on the Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. *Neurosci Lett* 313:69-72.



Elles, R., Mountford, R. 2004. "Molecular diagnosis of genetic diseases". Segunda edición. Humana Press USA.

Furukawa, H., Kitamoto, T., Tanaka, Y. y Tateishi, J. 1995. New variant prion protein in a Japanese family with Gerstmann Straüssler syndrome. Mol Brian Res 30:385-388.

Gajdusek, D. C., Gibbs Jr, C. J. y Alpers M. 1966. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. Nature 209:794-796.

Gajdusek, D. C. Zigas, V. 1957. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "Kuru" in the native population. N Engl J Med 257: 974-978.

Gauczynski, S., Krasemann, S., Bodemer, W. y Weiss, S. 2002. Recombinant human prion protein mutants huPrP D178N/ M129 (FFI) and huPrP+9OR (f CJD) reveal proteinase K resistance. J Cell Sci 115:4025-4036.

Geldermann, H., Bartenschlager, H., Preuss, S., Melchinger-Wild, E., Herzog, K. y Zerr, I. 2006. Polymorphic microsatellite sites in the *PRNP* region point to excess of homozygotes in Creutzfeldt-Jakob disease patients. Gene 382:66-70.

Gerstmann, J., Straüssler, E. y Scheinker, J. 1936. Über eine eigenartige hereditary-familiäre Erkrankung des Zentralnerven-systems. Z Neurol 154:736-762.

Glazel, M., Stoeck, K., Seeger, H., Lührs, T. y Aguzzi, A. 2005. Human prion diseases. Molecular and clinical aspects. Arch Neurol 62:545-552.

Gibbs Jr, C. J., Gajdusek, C. D., Asher, D. M., Alper, M. P., Beck, E., Daniel, P. M. y Mathews, W. B. 1968. Transmission of experimental Kuru to the spider monkey. Science 162:693-694.

Goldfarb, L. G., Petersen, R. B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A. C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W. W., Haltia, M., Wills, P. R., Hauw, J. J., McKeever, P. E., Monari,



L., Schrank, B., Swergold, G. D., Autilio-Gambetti, L., Gajdusek, C. D., Lugaresi, E. y Gambetti, P. 1992. Fatal Familial Insomnia and Familial Creutzfeldt-Jakob disease: Disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258:806-807.

Goldgaber, D., Goldfarb, L. G., Brown, P. D., Asher, D. M., Brown, W. T., Lin, S., Teener, J. W., Feinstone, S. M., Rubenstein, R., Kascsak, R. J., Boellaard, J. W. y Gajdusek, C. D. 1989. Mutations in Familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann Straüssler Scheinker's syndrome. *Exp Neurol* 106:204-206.

Griffith, J. S. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* 215:1043-1044.

Hadlow, W. J. 1959. Scrapie and Kuru. *Lancet* 2:289-290.

Heidenhain, A. 1929. Klinische und Anatomische Untersuchungen über eine eigenartige Erkrankung des Zentrlnervensystems im Praesenium. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie* 118: 49.

Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J. y Prusiner, S. B. 1989. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann Straüssler syndrome. *Nature* 338:342-345.

Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C. y Houston, F. 2002. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 83:2897-2905.

Jakob, A. 1921. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Bufunde. *Zitschr ges Neurol Psychiat* 64:147-228.

Jeong, B-H., Lee, K-H., Kim, N-H., Jin, J-K., Kim, J-II., Carp, R. I. y Kim, Y-S. 2005. Association of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with homozygous genotypes at *PRNP* codons 129 and 219 in the Korean population. *Neurogenetics* 6:229-232.



Jiménez-Huete, A., Lievens, M. J., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. y Prelli, F. 1998. Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am J Pathol* 153 (5):1561-1572.

Johnson, R. T. y Gibbs, C. J. 1998. Creutzfeldt-Jakob disease and Transmissible Spongiform Encephalopathies. *N Engl J Med* 339 (27):1994-2004.

Kitamoto, T., Ohta, M., Doh-ura, K., Hitoshi, S., Terao, Y. y Tateishi, J. 1993. Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann Straüssler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 191 (2):709-714.

Kretzschmar, H. A. 2003. Diagnosis of prion disease. *Clin Lab Med* 23: 109-128.

Labate, A., Manna, I., Gambardella, A., Le Piane, E., La Russa, A., Condino, F., Cittadella, R., Aguglia, U. y Quattrone, A. 2007. Association between the M129V variant allele of *PRNP* gene and mild temporal lobe epilepsy in women. *Neurosci Lett* 421(1):1-4.

Lemstra, A. W., Meegen, M. T., Vreyling, J. P., Meijerink, P. H., Jansen, G. H., Bulk, S., Baas, F. y Gool, W. A. 2000. 14-3-3 testing in diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. A prospective study in 112 patients. *Neurology* 55:514-516.

Lucotte, G. y Mercier, G. 2005. The population distribution of the Met allele at the *PRNP* 129 polymorphism (a high risk factor for Creutzfeldt-Jakob disease) in various regions of France and in West Europe. *Infect Genet Evol* 5:141-144.

Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P. y Lugaresi, A. 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *New Engl J Med* 315: 997-1003.

Mahal, S. P., Asante, E. A., Antoniou, M. y Collinge, J. 2001. Isolation and functional characterization of the promotor region of the human prion protein gene. *Gene* 268:10-114.



Martínez, B. M., Ramos, P. J., Vega, R. y Escobar, A. 1995. La Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, correlación clínica, electrofisiológica e histopatológica. *Gac Med Méx* 131:591-596.

Martorell, L., Valero, J., Mulet, b., Gutiérrez-Zotes, A., Cortés, M. J., Jarrod, M., Perez, M., Labad, A. y Vilella, E. 2007. M129V variation in the prion protein gene and psychotic disorders: Relationship to neuropsychological and psychopathological measures. *J Psych Res* 41 (10):885-892.

Mead, S. 2006. Prion disease genetics. *Eur J Hum Genet* 14:273:281.

Merz, P. A, Somerville, R. A, Wisniewski, H. M. y Iqbal, K. 1981. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 54: 63-74.

Mishra, R. S., Gu, Y., Bose, S., Verghese, S. y Kalepu, S. 2002. Cell surface accumulation of a truncated transmembrane prion protein in Gerstmann Straüssler Scheinker disease P102L. *J Biol Chem* 277 (27):24554-24561.

Nadal, R. C., Abdelraheim, S. R., Brazier, M. W., Rigby, S. E., Brown, D. R. y Viles, J. H. 2007. Prion protein does not redox-silence Cu^{2+} , but is a sacrificial quencher of hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 42:79-89.

Oesch, B., Westaway, D., Walchi, M., Mckinley, M. P., Kent, S.B.H., Aebersold, R., Barry, R. A. y Tempst C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.

Pan, K-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. y Prusiner, S. B. 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10962-10966.

Panegyres, P. K., Toufexis, K., Kakulas, B. A., Cerneváková, L., Brown, P., Ghetti, B., Piccardo, P. y Dlouhy, S. R. 2001. A new *PRNP* mutation (G131V) associated with Gerstmann-Straüssler-Scheinker disease. *Arch Neurol* 58 (11):1899-1902.



Parchi, P., Chen, S. G., Brown, P., Zou, W., Capellari, S., Budka, H., Hainfellner, J., Reyes, P. F., Golden, G. T., Hauw, J. J., Gajdusek, C. D. y Gambetti, P. 1998. Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann Straüssler Scheinker disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8322-8327.

Parchi, P., Zou, W., Wang, W., Brown, P., Capellari, S., Ghetti, B., Kopp, N., Schulz-Schaeffer, W. J., Kretzschmar, H., Head, M. W., Ironside, J. W., Gambetti, P. y Chen, S. 2000. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10168-10172.

Pérez, C. E., Fernández, V. J-A. y Herrera, C. M. 2005. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob: descripción de tres casos y revisión bibliográfica. *Med Int Méx* 21 (6):473-476.

Piccardo, P., Liepnieks, J. J., William, A., Dlouhy, S. R., Farlow, M. R., Young, K., Nochlin, D., Bird, T. D., Nixon, R. R., Ball, M. J., DeCarli, C., Bugiani, O., Tagliavini, F., Benson, M. D. y Ghetti, B. 2001. Prion proteins with different conformations accumulate in Gerstmann Straüssler Scheinker disease caused by A117V and F198S mutations. *Am J Pathol* 158 (6):2201-2207.

Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.

Prusiner, S. B. 1998a. The prion diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363-13383.

Prusiner, S. B. 1998b. The prion diseases. *Brian Pathol* 8:499-513.

Prusiner, S. B. 2001. Shattuck Lecture – Neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* 344 (20):1516-1524.

Puckett, C., Concannon, P., Casey, C. y Hood, L. 1991. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49:320-329.

Reyes, T., Aguilar, S., Corona, R., Vega, I., Montalvo, C. y García-R, G. 2002. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Médica Sur Méx* 9 (2):79-87.



[Sambrook, J., Fritsch, E. E. y Maniatis, T. 1989. "Molecular Cloning: A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY USA.](#)

[Scholz, S., Xiomerisiou, G., Fung, H. C., Eerola, J., Hellström, O., Papadimitriou, a., Hadjigeorgiou, G. M., Tienari, P. J., Fernandez, H. H., Mandel, r., Okun, M. S., Gwinn-Hardy, k. y Singleton, A. B. 2005. The human prion gene M129V polymorphism is not associated with idiopathic Parkinson's disease in three distinct populations. *Neurosci, Lett* 395:227-229.](#)

[Takahashi, H., Iwata, T., Kitagawa, Y., Takahashi, R. H., Sato, Y., Wakabayashi, H., Takashima, M., Kido, H., Nagashima, K., Kenney, K., Gibbs, C. J. y Kurata, T. 1999. Increased levels of \$\epsilon\$ and \$\gamma\$ isoforms of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 6 \(6\):983-985.](#)

[Tateishi, J. 1996. Transmission of human prion diseases to rodents. *Semin Virol* 7:175-180.](#)

[Taylor, D. R., Watt, N. T., Perera, W.S.S. y Hooper, N. M. 2005. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* 118:5141-5153.](#)

[Tompa, P. y Friedrich, P. 1998. Prion Protein as memory molecules: An hypothesis. *Neurosci* 86:1037-1043.](#)

[Toro, G., Pacheco, O. E., Sierra, U. E., Beltrán, M., Díaz, A., Parra, E. A. y Bonilla, E. 2005. Encefalopatías subagudas Espongiformes transmisibles \(ESET\). La teoría del prion enfermedades priónicas. *Acta Neurol Colomb* 21:134-162.](#)

[Wadsworth, J. D., Asante, E. A., Desbruslais, M., Linehan, J. M., Joiner, S., Gowland, I., Welch, J., Stone, L., Lloyd, S. E., Hill, A. F., Brandner, S. y Collinge, J. 2004. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science* 306 \(3\):1793-1796.](#)

[Watts, J. L., Balachandran, A. y Westaway, D. 2006. The Expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog* 2 \(3\):152-163.](#)



Weissmann, C., Enari, M., Klöhn, P-C., Rossi, D. y Fiechsig, E. 2002. Transmission of prion. Proc Natl Acad Sci USA 99:16378-16383.

Wieser, H. G., Schindler, K. y Zumsteg, D. 2006. EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. Clin Neurophysiol 117:935-951.

Woulfe, J., Kertesz, A., Frohn, I., Bauer, S., George-Hyslop, P. St. y Bergeron, C. 2005. Gerstmann Straüssler Scheinker disease with the Q217R mutation mimicking frontotemporal dementia. Acta Neuropathol 110:317-319.

Yamada, M., Itoh, Y., Inaba, A., Eada, Y., Takashima, M., Satoh, S., Kamata, T., Okeda, R., Kayano, T., Suematsu, N., Kitamoto, T., Otomo, E., Matsushita, M. y Mizusawa, H. 1999. An inherited prion disease with a PrP P105L mutation. Clinicopathologic and PrP heterogeneity. Neurology 53:181-188.

Young, K., Clark, H. B., Piccardo, P., Dlouhy, S. R. y Ghetti, B. 1997. Gerstmann Straüssler Scheinker disease with the *PRNP* P120L mutation and valine at codon 129. Mol Brain Res 44:147-150.

Yung, L., Huang, Y., Lessard, P., Legname, G., Lin, E. T., Baldwin, M., Prusiner, S. B., Ryou, C. y Guglielmo, B. J. 2004. Pharmacokinetics of quinacrine in the treatment of prion disease. BMC Infect Dis 4 (53):1-7.

A) SITIOS WEB

Gen Bank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>

Online Medelian Inheritance in Man (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>

The Human Gene Mutation Database (HGMD) <http://www.gene.ucl.ac.uk>

NCBI Molecular Variation Database (dbSNP) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

MadCow Home <http://www.mad-cow.org>

Ensembl Database http://www.ensembl.org/Homo_sapiens