



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN EL GEN
PRNP EN PACIENTES CON DEMENCIA DE RÁPIDA EVOLUCIÓN**

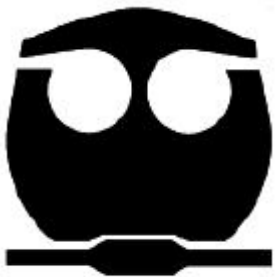
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LIZBETH ESMERALDA GARCÍA VELÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
VOCAL: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
SECRETARIO: Profesor: PETRA YESCAS GÓMEZ
1er. SUPLENTE: Profesor: NANCY MONROY JARAMILLO
2° SUPLENTE: Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

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

PETRA YESCAS GÓMEZ
ASESOR DEL TEMA

MARÍA ELISA ALONSO VILATELA
SUPERVISOR TÉCNICO

LIZBETH ESMERALDA GARCÍA VELÁZQUEZ
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora María Elisa Alonso Vilatela, por brindarme la oportunidad de participar en este y otros proyectos, por el apoyo recibido y la supervisión de este trabajo.

A mi tutora, la Doctora Petra Yescas Gómez, por el apoyo y confianza que me ha brindado. Gracias por el tiempo que ha dedicado a mi formación, por sus enseñanzas y consejos.

A la Doctora Nancy Monroy, por sus observaciones, recomendaciones y por darme la confianza de acercarme a ella cuando lo requiero.

A los miembros de mi jurado, por su buena disposición y valiosos comentarios.

DEDICATORIA

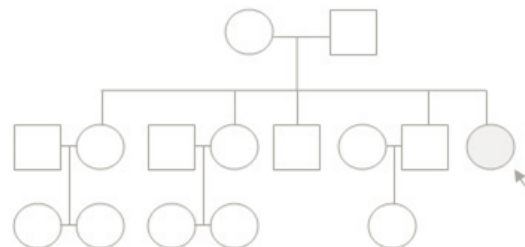
A mis padres, porque esto es un resultado de sus sacrificios y de la formación que nos han dado. Gracias por el cariño y apoyo incondicional que me han brindado en todo momento.

A mis hermanos, por estar siempre al pendiente, brindándome su cariño y apoyo.

A Ricardo, por estar a mi lado y hacer de cada día un día especial. Por su cariño y apoyo que han sido indispensables para darme fuerzas cuando las he necesitado.

A mis amigos de la facultad y del laboratorio, por compartir conmigo esta etapa y hacer de ella algo muy ameno. Gracias a Tania, Carla, Jazmín, George, y Gaby por estar ahí, mostrándome el significado de la amistad.

A Pablo, porque tuve la suerte de ser parte de su vida.



Índice

| | |
|--|----|
| I. Abreviaturas | 3 |
| II. Resumen. | 5 |
| 2.1 Planteamiento del problema | 7 |
| 2.2 Objetivos..... | 8 |
| 2.3 Hipótesis..... | 8 |
| III. Marco teórico. | 9 |
| 3.1 El concepto de prión..... | 9 |
| 3.2 Gen <i>PRNP</i> | 11 |
| 3.3 La proteína prión..... | 13 |
| 3.3.1 Síntesis y estructura | 13 |
| 3.3.2 Degradación de la proteína prión | 15 |
| 3.4 Polimorfismos en el gen <i>PRNP</i> y susceptibilidad a enfermedades priónicas. .. | 15 |
| 3.5 Mutaciones en el gen <i>PRNP</i> | 17 |
| 3.6 Familia de genes <i>PRNP</i> (PrP-GF) | 23 |
| 3.7 Localización de la proteína prión..... | 26 |
| 3.8 Funciones de la proteína prión | 28 |
| 3.8.1 Ligandos de PrP ^C y señalización intracelular | 28 |
| 3.8.2 PrP ^C en la regulación del ciclo celular y diferenciación | 29 |
| 3.8.3 Regulación por cobre | 29 |
| 3.8.4 Sinapsis y desarrollo neuronal | 30 |
| 3.8.5 Actividad antioxidante | 30 |
| 3.8.6 Función en el sistema inmune..... | 31 |
| 3.8.7 PrP ^C y otras enfermedades | 31 |
| 3.9 Modelos animales | 31 |
| 3.10 Modelo de interacción PrP ^C -PrP ^{Sc} | 32 |
| 3.11 Enfermedades priónicas en el humano | 35 |
| 3.11.1 Diagnóstico de las enfermedades priónicas | 37 |
| 3.11.2 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) | 39 |
| 3.11.3 Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)..... | 44 |
| 3.11.4 Insomnio Familiar Fatal | 45 |

| | |
|--|----|
| 3.11.5 Kuru..... | 46 |
| 3.12 Enfermedades causadas por priones en animales | 46 |
| IV. Diseño experimental..... | 49 |
| 4.1 Población de estudio | 49 |
| 4.1.1 Pacientes | 49 |
| 4.1.2 Grupo control..... | 50 |
| 4.2 Toma de muestra..... | 50 |
| 4.3 Extracción de DNA genómico..... | 50 |
| 4.4 Cuantificación del DNA | 51 |
| 4.5 Análisis de integridad del DNA..... | 51 |
| 4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 52 |
| 4.7 Resolución de productos de PCR..... | 53 |
| 4.8 Purificación de productos de PCR | 53 |
| 4.9 Reacción de secuenciación | 54 |
| 4.10 Purificación de productos de reacción de secuenciación..... | 54 |
| 4.11 Secuenciación automatizada..... | 55 |
| 4.12 Análisis de la secuencia..... | 55 |
| V. Resultados..... | 56 |
| 5.1 Población estudiada | 56 |
| 5.2 Cuantificación de DNA genómico | 57 |
| 5.3 Análisis de integridad de DNA genómico | 57 |
| 5.4 Análisis de productos de PCR..... | 57 |
| 5.4 Polimorfismos y mutaciones encontradas..... | 58 |
| 5.5 Frecuencias del polimorfismo M129V..... | 62 |
| VI. Análisis de resultados | 63 |
| VII. Conclusiones..... | 69 |
| VIII. Bibliografía | 70 |
| IX. Apéndice..... | 83 |
| a. Reactivos..... | 83 |
| b. Equipos y materiales | 83 |
| c. Índice de tablas..... | 84 |
| d. Índice de ilustraciones..... | 85 |

I. Abreviaturas

| | |
|------------|---|
| aa | Aminoácido |
| BSE | Encefalopatía espongiforme bovina |
| C-terminal | Extremo carboxilo terminal de la proteína |
| CJD | Enfermedad de Creutzfeldt Jakob |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| Dpl | Proteína Doppel |
| EEG | Electroencefalograma |
| EPH | Enfermedad priónica heredable |
| fCJD | Enfermedad de Creutzfeldt Jakob familiar |
| FFI | Insomnio Familiar Fatal |
| GPI | Glicosilfosfatidilinositol |
| GSS | Gerstmann Sträussler Scheinker |
| HDL-1 | Enfermedad de Huntington tipo 1 |
| iCJD | Enfermedad de Creutzfeldt Jakob iatrogénica |
| kDa | Kilodaltones |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LINE | Elemento largo intercalado |
| mL | Mililitros |
| mlncRNA | mRNA largo no codificante |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| μL | Microlitros |

| | |
|-------------------|--|
| N-Terminal | Extremo amino terminal de la proteína |
| Ng | Nanogramos |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ORF | Marco de lectura abierta |
| OPR | Repeticiones de octapéptidos |
| OPRI | Inserción de repeticiones de octapéptidos |
| p.b. | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| <i>PRNP</i> | Gen codificante de la proteína Prión en el humano. |
| PrP | Proteína prión |
| PrP ^C | Proteína prión celular |
| PrP ^{Sc} | Proteína prión scrapie |
| PSWC | Complejos de ondas agudas periódicas |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| RE | Retículo endoplásmico |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| sCJD | Enfermedad de Creutzfeldt Jakob esporádica |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| TSE | Encefalopatía espongiforme transmisible |
| UP | Ubiquitina-proteasoma |
| vCJD | Variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob |

II. Resumen.

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (TES) son padecimientos irreversibles, crónicos y fatales que afectan principalmente el sistema nervioso central de humanos y animales infectados. Dentro de este grupo, han sido descritos en el humano padecimientos tales como la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD), la enfermedad de Gerstmann Sträussler Scheinker (GSS), el kuru y el insomnio familiar fatal (FFI). La incidencia de estas enfermedades es extremadamente baja, presentándose un caso por cada millón de habitantes por año como promedio mundial para la CJD, que es la enfermedad más frecuente de este grupo.

Estas enfermedades son clasificadas en base a su etiología como esporádicas, transmisibles o hereditarias, representando estas últimas 10 a 15% de los casos y segregando con un patrón de herencia autosómico dominante.

En el gen *PRNP*, el cual codifica para la proteína prión celular, se han descrito numerosas mutaciones puntuales, codones de paro prematuro e inserción de repeticiones de octapéptidos. Estas mutaciones son responsables del cambio en la secuencia de aminoácidos y estructura de la proteína prión, modificando así sus propiedades fisicoquímicas, alterando su función y facilitando la formación de fibrillas proteicas responsables de la espongiosis y astrogliosis cerebral, la cual conlleva entre los principales síntomas a una demencia de rápida evolución, signos piramidales y extrapiramidales, mioclonía, ataxia, fatiga, insomnio y pérdida de peso.

La proteína prión y las enfermedades priónicas vinieron a romper paradigmas en la biología sobre las propiedades e interacciones de las proteínas. En el presente trabajo se hace una breve revisión sobre las propiedades de esta peculiar proteína, abordando aspectos tales como su estructura, interacción y posibles funciones, así como del gen que la codifica, sus características y la importancia de las variaciones que en el se presentan, y que en muchos casos, conllevan a las enfermedades priónicas.

En este estudio, se llevó a cabo la secuenciación del gen *PRNP* en 15 pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, los cuales presentaban una demencia de rápida evolución y habían sido diagnosticados con probable enfermedad priónica.

Se encontró la mutación E200K en seis pacientes y la mutación T188R en tres pacientes, dichas mutaciones están acopladas a diferentes polimorfismos en el codón 129. Los resultados fueron comparados con un grupo control de 100 individuos obtenido previamente por el mismo grupo de trabajo.

Las mutaciones encontradas en el gen *PRNP*, así como el fenotipo de los nueve pacientes que las portan, corresponden a la enfermedad de Creutzfeldt Jakob.

En aquellos pacientes que no presentan mutaciones en el gen *PRNP*, no puede descartarse la existencia de una de estas enfermedades, pero su diagnóstico debe confirmarse por otros métodos, ya que como se verá más adelante, la presencia de mutaciones en el gen *PRNP* no es la única causa de las enfermedades priónicas.

Son escasos los reportes que existen en México sobre pacientes con enfermedades priónicas, y a excepción del estudio de la familia con enfermedad de GSS reportada por el mismo grupo de trabajo, éstos son los primeros datos de enfermedades priónicas en general en población mexicana que involucran el análisis del gen *PRNP*. Llama la atención que en un periodo tan corto de tiempo (2 años) se presenten tantos casos de una enfermedad con tan baja frecuencia, lo cual sugiere que la prevalencia de estas enfermedades está subestimada, o bien, que no se está realizando un diagnóstico correcto de las mismas.

2.1 Planteamiento del problema

El entendimiento de las enfermedades priónicas se encuentra aún inconcluso al no conocerse los mecanismos por los cuales se produce un plegamiento anómalo de la proteína prión y ésta logra su replicación, ni las funciones que la proteína prión celular normal realiza. Este desconocimiento influye también en el hecho de que hasta el momento no se tenga una cura para estas enfermedades, las cuales cursan con síntomas crónicos y progresivos que conllevan a la muerte en un periodo de un año en promedio a partir del inicio de los síntomas.

La transmisibilidad ampliamente comprobada de estas enfermedades, plantea un riesgo de salud pública, por lo cual es necesario realizar un diagnóstico certero de éstas, y una parte elemental dicho diagnóstico, es el análisis de la secuencia del gen *PRNP*.

Como ya se ha mencionado, las mutaciones en este gen son causantes de enfermedades priónicas, y dado su patrón de herencia autosómico dominante, representan un factor de riesgo para la descendencia de los portadores. Es por esto, que el análisis del gen *PRNP* en pacientes no sólo servirá para confirmar el diagnóstico de la enfermedad, sino que dará pie al asesoramiento genético de las familias en riesgo.

Por otro lado, tal como se mencionó previamente, a excepción de un estudio de la enfermedad de GSS realizado por el mismo grupo de trabajo, no existen reportes en la literatura que aborden el análisis del gen *PRNP* en pacientes mexicanos con enfermedades priónicas, por lo cual, este estudio es de utilidad para conocer la presencia e influencia de variaciones en este gen en pacientes mexicanos, así como para brindar una idea sobre la prevalencia de estas enfermedades en nuestra población y la existencia de factores de riesgo asociados a ella.

2.2 Objetivos

- Identificar las mutaciones y polimorfismos presentes en el gen *PRNP* en pacientes mexicanos con demencia de rápida evolución y diagnóstico de probable enfermedad priónica.
- Analizar la influencia del polimorfismo M129V como factor de riesgo en las enfermedades priónicas.
- Realizar una correlación genotipo – fenotipo de los pacientes estudiados.

2.3 Hipótesis

Dados los reportes en la literatura sobre la etiología de las enfermedades causadas por priones y la influencia del polimorfismo M129V en el fenotipo, se espera que sólo un porcentaje de los pacientes diagnosticados clínicamente con probable enfermedad priónica presenten mutaciones en el gen *PRNP*, y que las mutaciones encontradas estén acopladas a diferentes polimorfismos en el codón 129, presentando un inicio más tardío aquellos pacientes heterocigotos para este polimorfismo.

III. Marco teórico.

3.1 El concepto de prión

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) o enfermedades priónicas, son un grupo de padecimientos neurodegenerativos que fueron descritos por primera vez en ovejas y cabras, denominado entonces “scrapie”. Los animales con scrapie mostraban cambios en el comportamiento, irritabilidad, temblor, convulsiones, pérdida de peso, una tendencia a rascar (de ahí surge el término “scrapie”) y la muerte en unos pocos meses. El análisis histopatológico del cerebro de animales infectados mostró espongiosis, astrogliosis (incremento anormal del número de astrocitos) y muerte neuronal. [1]

Enfermedades con fenotipos similares en el humano comenzaron a ser reportadas en la década de 1920. Los primeros reportes fueron realizados por Hans Creutzfeldt y Adolf Jakob de manera aislada, y posteriores reportes fueron publicados por Heidenhein y el grupo de trabajo de J. Gerstmann, pero fue hasta el año de 1956 cuando el estudio de las enfermedades priónicas en humanos comenzó verdaderamente. [2,3,4]

En ese año, Gajdusek y Zigas comenzaron el estudio de una rara enfermedad que afectaba a los pobladores de las tierras altas orientales de Papúa, Nueva Guinea, esta enfermedad llamada kuru, provocaba temblor, falta de coordinación, síntomas siquiátricos y muerte. Estos investigadores prestaron especial atención al rito de canibalismo ahí practicado por la etnia Fore a través de distintas generaciones. [5]

Al conocer los hallazgos de Gajdusek, el patólogo veterinario Hadlow encontró una relación entre los análisis histopatológicos de pacientes con kuru y animales con scrapie, la cual comunicó a Gajdusek, haciéndole saber que ya había sido demostrada la transmisión del scrapie entre ovejas. Al saber esto, Gajdusek trabajó en la demostración de que el kuru podía ser transmitido a chimpancés, dicha evidencia de transmisibilidad le valió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1976. Sin embargo, el agente causal permanecía desconocido, y hasta ese momento, la hipótesis más aceptada aseveraba que las TSEs eran consecuencia de un lentivirus por los largos periodos de incubación. [5,6]

Como consecuencia de estos descubrimientos, los ritos de canibalismo cesaron y así la incidencia del kuru fue disminuyendo hasta prácticamente su desaparición. Además, se planteó una relación entre esta enfermedad y las reportadas por los investigadores contemporáneos a Creutzfeldt antes mencionados. [2]

Al no conocerse ni tenerse aislado el agente causal de estas enfermedades, los investigadores se centraron en su identificación. Experimentos realizados por Alper y colaboradores, mostraron que el agente infeccioso carecía de material nucleico, pues condiciones capaces de destruir DNA o RNA no afectaron la transmisión de la enfermedad, y casi al mismo tiempo, el matemático Griffith planteó la idea de que una proteína mal plegada podía ser el agente infeccioso. [7,8]

En 1982 Stanley B. Prusiner, al probarlo por más métodos, publicó que el agente causal no poseía material nucleico y demostró el carácter proteico del agente causal al exponerlo a compuestos degradantes de proteínas, mostrando que este agente resultaba ser menos o nada infeccioso después de estos tratamientos. Fue entonces cuando surgió el término de "prión", propuesto por el mismo Prusiner como abreviatura de "partícula proteica infecciosa". [9] Fueron él y otros investigadores quienes plantearon la teoría de que esta proteína tenía el potencial de replicarse a sí misma y por lo tanto propagar la infección. [10]

Desde entonces, Prusiner se enfocó en el aislamiento y purificación de esta proteína, a la cual se le atribuyeron propiedades sorprendentes de resistencia a proteasas y a inactivación por métodos fisicoquímicos rutinarios. [11] Los estudios de Prusiner sobre las TSEs lo hicieron acreedor del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1997. [2]

Poco después de los descubrimientos de Prusiner, alrededor de 1985, fue descubierta una proteína muy similar a la proteína prión en el ratón y el hámster, la cual era codificada por un gen, al cual se le llamó gen de la proteína prión, *Prnp*, y esta proteína, fue entonces llamada proteína prión celular o PrP^C. [12] En 1986, se descubrió el gen *PRNP* en humanos y otros mamíferos. Diversos grupos de investigación, incluyendo el de Prusiner, mostraron que la proteína prión, responsable de las enfermedades priónicas en humanos y animales, era una isoforma anormal de la PrP^C. Para distinguir entre ambas formas, se le llamó proteína prión scrapie o PrP^{Sc} a la isoforma anormal. [13,10]

3.2 Gen *PRNP*

El gen codificante de la proteína prión en el humano, *PRNP*, se encuentra en el *locus* 20p12-pter y consta de 20 kpb. Este gen está compuesto por dos exones, el exón 1 no traducido de 136 pb, un intrón de aproximadamente 12693 pb de tipo spliceosómico en fase cero y el exón 2 de 2354 pb que codifica para la proteína prión completa como lo muestra la Figura 1. [14-16]

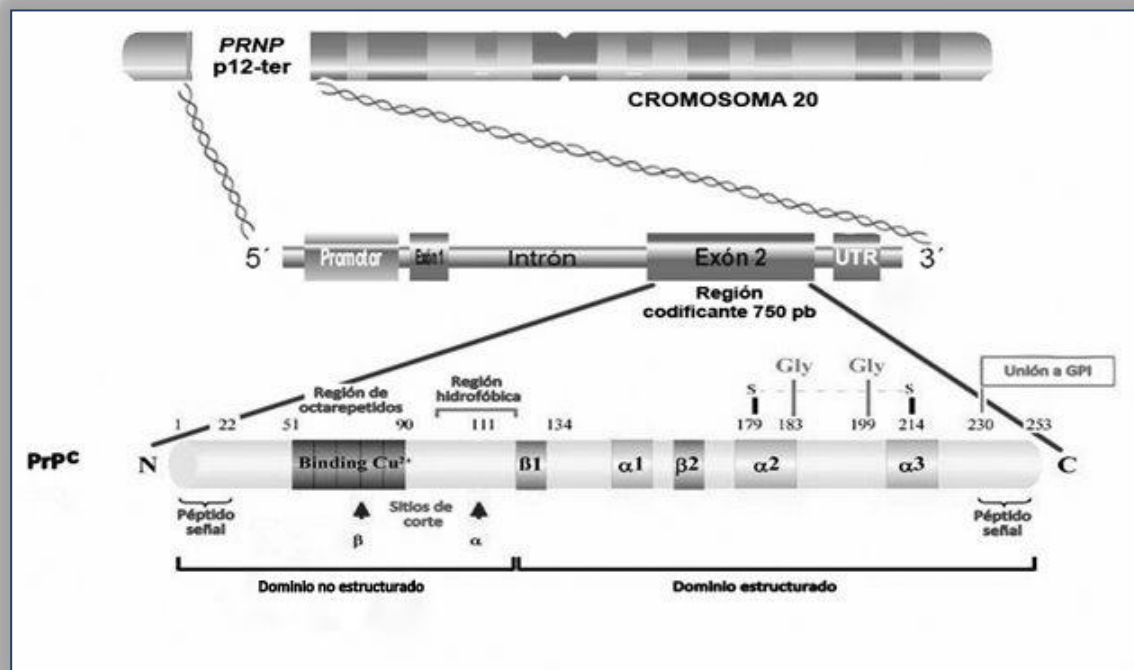


Figura 1 Localización y estructura del gen *PRNP*.

(Tomada y modificada de Mehrpour M, et al. 2010. [17]).

La región 5' del sitio de inicio transcripcional tiene un sitio rico en GC [16]. La región promotora contiene una caja CCAAT y sitios de unión a factores de transcripción como Sp-1, Ap-1, Ap-2, PPAR-gamma1, NF-1 y Max-1 entre otros. [18,19] Además, el promotor de *PRNP* contiene un elemento regulatorio de choque térmico que puede responder a estrés y resulta en un aumento en la síntesis de mRNA y la sobreexpresión de PrP^C, esto ha sido comprobado en distintas líneas celulares utilizando oxígeno hiperbárico, óxido nítrico o estados de hipoglicemia como modelos de estrés oxidativo. [17,20]

Los análisis de la secuencia de la región promotora en pacientes y controles son escasos, entre los hallazgos más relevantes se encuentra el realizado por Vollmert, quien sugiere que la presencia de una citosina en el polimorfismo SNP1368(T/C) se encuentra asociada a la sCJD. [21]

El codón de inicio se localiza a 10 nucleótidos del extremo 3' del sitio aceptor del corte y empalme, lo que evita la interrupción del mensaje y la existencia de formas alternativas. [18]

Hasta el momento, no hay evidencia de duplicaciones del gen *PRNP* en pacientes con enfermedades priónicas [22], y se ha observado una penetrancia incompleta de algunas de las principales mutaciones al encontrarse personas asintomáticas de edad avanzada portadoras de éstas, además de una expresividad variable en portadores afectados. [23]

La proteína prión se encuentra altamente conservada en mamíferos, los cuales presentan más del 50% de identidad en la secuencia de nucleótidos con respecto al humano. [24] Una de las regiones más conservadas es la región codificante de repeticiones de octapéptidos (conservación mayor a 95%). [25]

Esta identidad en la secuencia ha sido relacionada con la transmisibilidad de enfermedades por priones entre diferentes especies, cobrando especial relevancia los codones localizados entre los residuos 30 y 130. [26]

3.3 La proteína prión



Figura 2 Estructura de la PrP^C.

Obtenida por RMN a pH de 7. Denota el núcleo hidrofóbico en color grisáceo que contiene la región no estructurada. Se pueden apreciar las tres hélices α (HA, HB y HC), así como las dos láminas β plegadas (S1 y S2). (Tomada de Van der Kamp M, et al, 2009. [27]).

3.3.1 Síntesis y estructura

La proteína prión consta de 253 aminoácidos y tiene un peso de 32 a 35 kDa. La síntesis de PrP^C requiere la translocación de la proteína naciente al lumen del retículo endoplásmico, donde el péptido señal N-terminal y C-terminal son eliminados, quedando una proteína de 208 aminoácidos (residuos 23-230), a la cual es conjugado un residuo de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal. [17]

Una vez que está completamente plegada, la PrP^C entra al aparato de Golgi y posteriormente se ancla a la membrana celular insertando el residuo GPI como lo muestra la Figura 3. [28] El plegamiento nativo de la PrP^C ha sido determinado como un monómero por RMN a pH ácido y neutro. [29]

Esta proteína extracelular posee una cola larga y flexible N-terminal (residuos 23-128), un dominio globular (residuos 129-228) y un dominio C-terminal corto y flexible (residuos 229-230). [30] La secuencia y dominios de la PrP^C son mejor ilustrados en la Figura 4.

El dominio N-terminal es una cola flexible presente en la mayoría de las especies animales y contiene series de 4 o 5 repeticiones de ocho aminoácidos (PHGGGWGQ). [31] Las formas aberrantes truncadas de N-terminal de PrP^C ancladas a la membrana celular alteran la respuesta a estrés oxidativo y se vuelven resistentes a proteasas. [32]



Figura 3 PrP^C madura insertada a la membrana celular.

El dominio globular consiste de tres α -hélices y dos láminas β -plegadas. Contiene un cúmulo de residuos cargados positivamente (residuos 95 a 110) y una secuencia de residuos hidrofóbicos (112 a 133). La formación de puentes salinos e interacciones de puentes de hidrógeno a lo largo del dominio estructurado proporciona estabilidad a la estructura secundaria y terciaria de la proteína. [27,31]

El ancla de GPI se muestra insertado en la membrana en forma de esferas. La glicosilación se muestra a manera de ramificaciones en la parte superior. (Tomada de Van der Kamp M, et al, 2009. [27]).

El dominio C-terminal cobra importancia dado que mutaciones en el afectan la unión a GPI y promueven la acumulación de la proteína en el citosol provocando neurotoxicidad. [31,33]



Figura 4. Estructura lineal de la PrP^C. La figura ilustra los principales dominios de la proteína, así como los sitios de glicosilación y puentes disulfuro. (Tomada y modificada de Mehrpour M, et al. 2010. [17]).

3.3.2 Degradación de la proteína prión

En condiciones fisiológicas, la degradación de PrP^C ocurre vía proteosoma y endosomas. [34] Cuando se produce una PrP^C mal plegada, ésta es retenida en el RE y transportada al citoplasma, donde es marcada para su degradación por el sistema UP. [34,35] Pero en el caso de las PrP^{Sc}, que son mal plegadas y escapan del sistema de control del RE, estas se acumulan en el citosol como agregados insolubles resistentes a proteasas. Por otra parte, evidencia experimental muestra que el metabolismo alterado de PrP^C, como una consecuencia de ya sea una inhibición primaria del UP o un exceso de sustratos del UP, también produce un incremento en la cantidad de PrP^C citosólica, la cual llega a ser responsable de una neurotoxicidad. [36,37]

3.4 Polimorfismos en el gen *PRNP* y susceptibilidad a enfermedades priónicas.

Se han reportado seis polimorfismos en el gen *PRNP* (véase la Tabla 1), de los cuales el más estudiado es el M129V (c.385A>G), que juega un papel crítico en la susceptibilidad y modificación del fenotipo de las enfermedades priónicas. [23] Existe una marcada diferencia en la frecuencia alélica del codón 129 alrededor del mundo: en la población del Reino Unido y el norte de Europa, la frecuencia del alelo 129M es de alrededor de 0.65 con un ligero decremento a través de Europa hacia África y un marcado incremento hacia el continente Asiático. [38,39] El alelo 129V, es más frecuente sólo en el altiplano este de Papúa Nueva Guinea con una frecuencia de 0.55 y algunas poblaciones nativas americanas. [23]

Algunos autores plantean la hipótesis de que la alta prevalencia del alelo 129V del gen *PRNP* en muchas poblaciones de Centro y Sudamérica puede ser resultado de una presión selectiva ante la aparición posibles de epidemias similares al kuru, el cual se retomará más adelante, con base en datos históricos que refieren que el canibalismo era realizado entre los americanos, principalmente entre los aztecas. [40,41].

Sin embargo, esta hipótesis contradice hasta cierto punto las observaciones sobre la influencia del alelo M129V en la susceptibilidad a estas enfermedades, ya que se ha notado ampliamente que la heterocigosidad en este alelo confiere una mayor

protección contra la infección, representando un mayor riesgo la homocigosidad en este codón, especialmente para metionina. [23]

La relevancia del efecto del alelo M129V es mejor demostrado en pacientes con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (vCJD), en donde todos los casos analizados genéticamente, han sido homocigotos para 129M. [42]

El polimorfismo E219K, encontrado en poblaciones del este asiático, también tiene un efecto mayor en la susceptibilidad a enfermedades priónicas y puede modificar el fenotipo, dando como resultado un genotipo de protección la heterocigosidad en este codón. [43] Los polimorfismos en los codones G142S y N171S, más frecuentes en poblaciones africanas, no han sido probados para efectos de susceptibilidad a enfermedades priónicas, al igual que los polimorfismos I128M y V203I.[40]

En Papúa Nueva Guinea se identificó el polimorfismo G127V y se encontró que al igual que la mayoría, la heterocigosidad en este confiere cierta protección contra el kuru. [44]

Además de estas variantes puntuales, en los codones 51-91 del dominio N-terminal (que codifican un nonapéptido seguido de cuatro repeticiones de octapéptidos idénticos), se han descrito alteraciones en el número de repeticiones a manera de polimorfismos. [43] Una delección de una repetición de octapéptido ocurre como polimorfismo poco común en la población europea. [45]

Tabla 1. Polimorfismos presentes en el gen *PRNP*. Tomada y modificada de The Official Mad Cow Disease Home Page [46].

| DNA inicial | DNA final | AA inicial | AA final | Codón | Referencia |
|------------------------|-----------|------------|----------|-------|--------------------------------------|
| ggcGGctac | GGA | Gly | Val | G127V | Mead S (2009) N Engl J Med 361: 2056 |
| tacATGctg | GTG | Met | Val | M129V | Doh-Ura (1989) BBRC 163:974 |
| cccATCata | ATG | Ile | Met | I138M | Laplanche (2000) pers. comm |
| ttcGGCcag | AGC | Gly | Ser | G142S | Laplanche (2000) pers. comm. |
| agcAACcag | AGC | Asn | Ser | N171S | Samaia (1997) Nature 390:241 |
| gacGTTaag | ATT | Val | Ile | V203I | Peoc'h (2000) Hum Mutation 323: 482 |
| tacGAGagg ¹ | AAG | Glu | Lys | E219K | Barbanti (1996) Neurobiology 47:734 |

Se han realizado estudios de asociación entre las enfermedades priónicas y múltiples secuencias dentro y fuera del gen *PRNP*, entre las asociaciones propuestas se encuentra una entre la vCJD y el serogrupo HLA-DQB7, pero los resultados no han sido comprobados en muestras grandes. [47,48] De igual manera los genotipos del gen codificante de la proteína Doppel (*PRND*) y *APOE* han sido probados para asociación con enfermedades priónicas, con resultados inconclusos. [49-51]

3.5 Mutaciones en el gen *PRNP*

Las mutaciones presentes en el gen *PRNP* se clasifican en tres tipos:

- Mutaciones puntuales (sustitución de aminoácidos)
- Codones de paro prematuro
- Inserción de repeticiones de octapéptidos (OPRI).

Hasta el momento han sido descritas más de 36 mutaciones en el gen *PRNP*, incluyendo mutaciones de sustitución de aminoácidos, codones de paro prematuro, mutaciones silenciosas e inserción o delección de repeticiones de octapéptidos (véase la Tabla 2).

Tabla 2. Mutaciones puntuales reportadas en el gen *PRNP*. Tomada y modificada de The Official Mad Cow Disease Home Page [46].

| DNA Inicial | DNA Final | AA inicial | AA final | Codón | Referencia |
|-------------|-----------|------------|----------|-------|---------------------------------------|
| cagCCTcat | CCC | Pro | Pro | P68P | Windl (1999) Hum Gen 105:244. |
| aagCCGagt | CTG | Pro | Leu | P102L | Hsiao (1989) Nature 338:342. |
| aagCCAaaa | CTA | Pro | Leu | P105L | Kitamoto (1993) BBRC 191:709. |
| aagCCAaaa | ACA | Pro | Thr | P105T | Polymenidou (2010) Brain Pathol. |
| gcaGCAagc | GCG | Ala | Ala | A117A | Hsiao (1989) Nature 338:342 |
| gcaGCAagc | GTA | Ala | Val | A117V | Doh-Ura (1989) BBRC 163:974. |
| gggGGCctt | GGG | Gly | Gly | G124G | [Prusiner (1997) Science 278:245] |
| gacTATgag | TAG | Tyr | stop | Y145s | Ghetti (1996) PNAS 93:744 |
| aacCAAggtg | TAA | Gln | stop | Q160s | Finckh U (2000) Am J Hum Genet 66:110 |
| caaGTGtac | GTA | Val | Val | V161V | Prusiner (1997) Science 278:245 |
| cagAACaac | AAT | Asn | Asn | N173N | Laplanche (2000) pers. comm. |
| gtgCACgac | CAT | His | His | H177H | Ripoll (1993) Neurology 43:1934 |
| cacGACTgc | AAC | Asp | Asn | D178N | Goldfarb (1991) Lancet 337:425 |
| tgcGTCaat | ATC | Val | Ile | V180I | Kitamoto (1993) BBRTC 191:709 |

| | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----------|---|
| atcACAatc | GCA | Thr | Ala | T183A | Nitrini (1997) Ann Neurol 42:138 |
| cagCACacg | CGC | His | Arg | H187R | Cervenakova.(1999) Am. J. Med. Genet. 88(6):653 |
| cacACGgtc | AGG | Thr | Arg | T188R | Windl (1999) Hum Gen 105.244 |
| cacACGgtc | AAG | Thr | Lys | T188K | Finckh U (2000) Am J Hum Genet 66:110 |
| cacACGgtc | GAG | Thr | Ala | T188A | Collins S (2000) Arch. Neurol 57:1058 |
| cacACGgtc | ACA | Thr | Thr | T188T | Laplanche (2000) pers. comm. |
| gggGAGaac | AAG | Glu | Lys | E196K | Peoc'h (2000) Human Mutation #323 |
| aacTTCacc | TCC | Phe | Ser | F198S | Hsiao (1992) Nature Genet. 1:68 |
| accGAGacc | AAG | Glu | Lys | E200K | Goldgaber (1989) Exp. Neurol.106:204. |
| accGACggt | AAC | Asp | Asn | D202N | Piccardo (1998) J N Exp Neur 57:979 |
| accGACggt | GAT | Asp | Asp | D202D | Laplanche (2000) pers. comm. |
| gagCGCggtg | CGT | Arg | Arg | R208R | Laplanche (2000) pers. comm. |
| gagCGCggtg | CAG | Arg | His | R208H | Mastrianni (1996) Neurol.47:1305 |
| gtgGTTgag | ATT | Val | Ile | V210I | Pocchiarri (1993) Ann. Neurol.34:802. |
| gttGAGcag | CAG | Glu | Gln | E211Q | Peoc'h (2000) Human Mutation #323 |
| gagCAGatg | CAA | Gln | Gln | Q212Q | Windl (1999) Hum Gen 105.244. |
| gagCAGatg | CGG | Gln | Pro | Q212P | Piccardo (1998) J N Exp Neur 57:979 |
| accCAGtac | CGG | Gln | Arg | Q217R | Hsiao (1992) Nature Genet. 1:68. |
| cagAGAgga | AGG | Arg | Arg | R228R | Windl 1999 Hum Gen 105.244. |
| ggaTCGagc | TCA | Ser | Ser | S230S | Windl (1999) Hum Gen 105.244. |
| agcATGgtc | AGG | Met | Arg | M232 R | Kitamoto (1993) BBRC 191:709. |
| tctCCAacct | TCA | Pro | Ser | P238S | Windl (1999) Hum Gen 105.244 |

La mayoría de estas mutaciones están relacionadas a una enfermedad priónica particular como lo muestra la Figura 5.

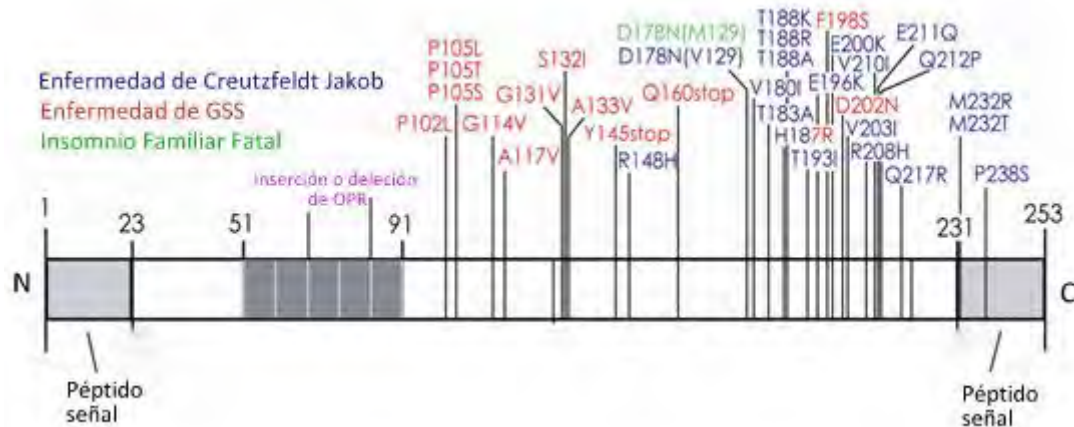


Figura 5. Mutaciones descritas en el gen *PRNP*. Los colores muestran la relación entre las mutaciones y la enfermedad que provocan. La inserción o delección de repeticiones de octapéptidos (OPR) puede provocar CJD o enfermedad de GSS dependiendo el número de OPR insertados o deletados. (Tomada y modificada de Van der Kamp M, et al. 2009). [27]

A continuación se presenta una breve descripción de las mutaciones más estudiadas y su repercusión, haciendo hincapié en aquellas de mayor relevancia para el presente trabajo y abordándolas con base en su localización, iniciando por el dominio N-terminal, la región globular y finalmente la región C-terminal.

Mutaciones en el dominio N-terminal y de paro prematuro

Hay cuatro residuos asociados a mutaciones causantes de GSS en el dominio N-terminal: P102L, P105L/S/T, G114V y A117V. Con base en resultados experimentales, el dominio N-terminal está involucrado en la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}. [52] Los residuos 112-119 son necesarios para la formación y propagación de PrP^{Sc} y la importancia de mutaciones en este dominio está apoyada por el hecho de que un pequeño péptido neurotóxico de PrP de ratón (con residuos 23-88) con diversas mutaciones puede formar agregados de PrP resistente a proteasas. [53] Hay poca evidencia de un efecto molecular directo de las mutaciones en esta región sobre la estructura globular de PrP^C o su conversión a PrP^{Sc}. Es posible que la formación de láminas β en la región N-terminal sea potenciada por estas mutaciones, pero podría ser también que la habilidad de estas mutaciones de causar enfermedad se incremente debido a interacciones más complejas a nivel celular. [27,54]

Han sido observadas dos mutaciones de paro que resultan en una versión truncada de PrP^C: Y145s y Q160s. Se estudió la agregación in vitro de los fragmentos 23-144 y 23-159 de PrP; y los resultados mostraron que el fragmento con la mutante Q160s (que incluye la hélice HA) se agrega mucho más rápido que la construcción más corta. Estudios con la mutante Y145s muestran que el dominio globular C-terminal es requerido normalmente para importar la PrP completa al retículo endoplásmico, si esto no ocurre, una gran parte de PrP truncada no es procesada post-traduccionalmente y ocurre una rápida degradación por parte del proteasoma.[55,56] Por otra parte, se encontró también que un fragmento recombinante conteniendo los residuos 23-144 puede convertirse espontáneamente en una forma fibrilar, siendo los residuos 138-141 esenciales para su formación.[57]

Mutaciones en el dominio globular

- **Inserción de repeticiones de octapéptidos (OPRI).**

La inserción de más de tres repeticiones de octapéptidos adicionales en la región N-terminal de PrP causa enfermedad priónica heredable. La edad de inicio promedio reportada en pacientes por OPRI >3 repeticiones es de 35 años y la duración de la enfermedad de 7 años. [58,59] Las características clínicas e histopatológicas son muy variables e incluyen aquellas observadas en pacientes con CJD y algunos desórdenes premórbidos de personalidad caracterizados por criminalidad, agresión, delincuencia e hipersexualidad. [60]

Un número de reportes de enfermedad priónica asociados a pequeños OPRI (<4 repeticiones extra) parecen tener un fenotipo diferente con relación a las inserciones grandes, con una ausencia de historia familiar, una edad de inicio más tardía y duración corta. [61]

- **Mutaciones que afectan la interacción de puentes salinos.**

Los puentes salinos entre residuos en diferentes partes de la región de la proteína estabilizan su estructura terciaria. Seis mutaciones causantes de enfermedad pueden afectar directamente las interacciones entre puentes salinos en el dominio globular de PrP^C, y estas son: R148H, E196K, E200K, R208H y E211Q. [23]

La mutación puntual E200K (c.598G>A) es la causa más frecuente de CJD en todo el mundo, contribuye en más del 70% de los casos de CJD de tipo familiar (fCJD) y produce un cambio en la secuencia del codón 200 de GAG a AAG, resultando en la sustitución del aminoácido lisina por glutamato.[62]

Los fenotipos homocigotos y heterocigotos de pacientes con esta mutación son similares, comprobando la dominancia de la mutación en el gen *PRNP*. [63]

Al hacer el análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) de la proteína prión con la mutación E200K, no se encontraron diferencias notables en la estructura con respecto a la PrP^C. [64] Posteriores análisis mostraron que la estabilidad termodinámica no es afectada significativamente, aunque algunos autores han sugerido que esta variante puede afectar la estabilidad de la hélice HC [65] o la hélice HA [66]. Los cambios más significativos encontrados son con respecto al potencial electrostático de la superficie de la proteína, lo cual puede causar anomalías en la interacción de PrP con otras proteínas en la célula o en la membrana celular misma. Además, se ha observado que en agregados de PrP^{Sc} con PrP E200K, la glicosilación es afectada. [27,66]

Esta mutación fue identificada por primera vez en una familia originaria de Polonia, y estudios recientes muestran que esta mutación tiene una alta frecuencia en pacientes de fCJD en Eslovaquia, Libia (población judía), Chile, Italia y Japón. [62] El rango de incidencia anual en algunas de estas poblaciones es mucho más alto que el promedio mundial, calculándose una frecuencia de hasta ~200/1,000,000 en una población rural de Eslovaquia, ~75/1,000,000 entre judíos de Libia y casi 18/1,000,000 en el centro de Chile. [67-69] La fCJD también ha sido descrita en judíos griegos y en grupos de no judíos en España, la Gran Bretaña y Austria. Por medio de análisis de ligamiento se ha mostrado que pacientes con CJD quienes se originaron de poblaciones de judíos de Libia o Túnez, y de poblaciones no judías españolas, italianas y chilenas, comparten un haplotipo asociado a la mutación E200K, sugiriendo un origen común. El análisis a fondo sobre el origen de esta mutación, sugiere que la fCJD es endémica de Libia y la mutación E200K surgió en ese lugar, y que el haplotipo ahí originado pudo haber sido llevado a España con la migración de judíos y convertido en el nuevo haplotipo como producto de la

recombinación. De manera que este nuevo haplotipo generado en la península ibérica fue difundido hacia los países mediterráneos y de Sudamérica.[62]

Otra de las mutaciones más importantes que afecta los puentes salinos en el dominio globular es la mutación D178N, la cual puede también alterar interacciones entre puentes de hidrógeno. Es claro que la mutación D178N reduce la barrera para la formación del agregado PrP^{Sc}, aunque existen ideas controvertidas sobre el mecanismo por el cual esto ocurre. [27]

● Mutaciones en residuos polares

Tres de las mutaciones más importantes en residuos polares son encontradas en la hélice HB.

La mutación en T183A puede causar una glicosilación anormal, y afecta el plegamiento *in vivo* y el anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI). [70]

La mutación H187R, promueve la formación de depósitos de PrP^{Sc}, como consecuencia de la acumulación de la proteína en lisosomas al no ser transportada a la membrana celular. Esta mutación puede romper la supuesta interacción entre las hélices HB y HA. [27]

La mutación en el codón T188, que puede ser por R, K o A, causa fCJD. Un estudio empleando un modelo celular en ratón indicó que las mutantes de PrP T188R y T188K son glicosiladas e insertadas en la membrana celular, similar a la PrP silvestre. Estas PrP^{Sc} mutadas, sin embargo, muestran una resistencia a proteinasa K e insolubilidad en detergentes, lo cual produce un grado de agregación más alto. [71]

Otras tres mutaciones patogénicas de residuos polares son localizadas en la hélice HC. La primera es D202N, estudios con RMN muestran que desestabiliza la estructura por completo llevando a la formación de agregados en el retículo endoplásmico (RE) sin alcanzar la conformación madura. La mutación Q212P inserta una prolina en la mitad de la hélice HC afectando su estructura y formando agregados en el citosol con inhibición del proteasoma. La última mutación en HC es Q217R, que no permite la unión al ancla de GPI, lo cual causa el deterioro en el transporte a la superficie celular. [27]

● Mutaciones hidrofóbicas

Las mutaciones en residuos hidrofóbicos del dominio globular incluyen a la G131V, que puede causar la extensión de las láminas β S1/S2 y a las mutaciones T183A, V180I y F198S, que causan una glicosilación atípica, interferencia con el anclaje a GPI y/o cambios en el plegamiento de de PrP. Por estas mutaciones se pueden presentar agregosomas, un decremento en la función anti-Bax y cambios en la estabilidad termodinámica. [27]

Mutaciones en el dominio C-terminal

Hay tres mutaciones en el péptido señal GPI asociadas con fCJD: M232R, M232T y P238S. El mecanismo de citotoxicidad de estas mutantes es desconocido, ya que el péptido señal es separado rápidamente durante la síntesis de la PrP^C y la translocación en el RE. Recientemente se mostró que M232R y M232T no interfieren con la adición al ancla de GPI, pero causan que PrP sea unida a la membrana en una orientación alterna. [27,72]

Haciendo un breve resumen, en general, cuando residuos cargados o polares son involucrados, interacciones secundarias o terciarias de puentes de hidrógeno estabilizantes son frecuentemente afectadas.

Las mutaciones en el núcleo hidrofóbico de PrP usualmente resultan en procesamientos o plegamientos defectuosos y el efecto de mutaciones en el dominio flexible N-terminal de PrP no es claro aún, mientras que mutaciones causando altos prematuros resultan en una proteína truncada de rápida agregación. [27]

3.6 Familia de genes *PRNP* (PrP-GF)

El gen *PRNP*, junto con otros dos genes (*PRND* y *PRNT*), está localizado en la región p12/p13 del cromosoma 20, el cual ha sido nombrado *locus PRNP* (véase la Figura 6). La familia de genes PrP (PrP-GF) es un conjunto de genes parálogos y ortólogos de PrP. [25]



Figura 6. Estructura del locus PRNP.

El gen *PRND* comprende dos exones, codifica una proteína de 179 aminoácidos llamada Doppel (Dpl), que presenta una alta similitud con PrP^C en términos de estructura y topología de proteínas (véase Fig 4). [14,25]

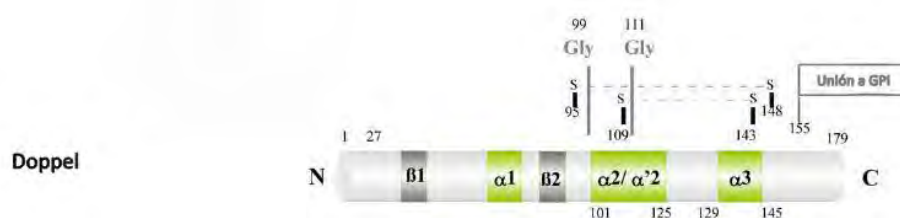


Figura 7. Estructura lineal de Doppel. Esta proteína comparte aproximadamente 25% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el dominio globular C-terminal de PrP^C. (Tomada y modificada de Mehrpour M, et al. 2010. [17]).

El gen *PRND*, el cual se encuentra ampliamente conservado en mamíferos, es expresado en varios tejidos durante el desarrollo fetal, pero en la edad adulta se expresa principalmente en testículo. A pesar de esto, se ha demostrado que su expresión en el sistema nervioso central (SNC) puede provocar neurodegeneración, aunque no es claro si el genotipo de Doppel interviene en la adquisición de CJD iatrogénica (iCJD) o la vCJD. [17,73]

Se propuso que las funciones de esta proteína son opuestas a las de PrP^C. De hecho, la toxicidad mediada por Dpl en células de Purkinje es revertida por la introducción de PrP^C silvestre, pero es poco claro el papel de Dpl, ya que muestra una baja expresión en el cerebro adulto. [16]

El gen *PRNT* es el gen más cercano a *PRNP* y *PRND* en humanos, y como éstos, tiene una estructura de dos exones, pero no tiene homología detectable con ellos en

la secuencia. Consta de un 48% de homólogos con transposones (elementos LINE). [16,74]

PRNT no parece ser un gen codificante de proteína, sino más bien una clase de mRNA largo no codificante (lncRNA) ampliamente conservado en el humano y otros mamíferos. [74,75]

Fuera del *locus* de la PrP-GF, en el *locus* 10q26.3 se presenta *SPRN*, que al igual que *PRNP*, *PRND* y *PRNT* comprende dos exones, con el marco de lectura abierta (ORF) completo contenido en el segundo exón. [16,76] Este gen codifica para una proteína de 130-150 aa llamada Shadoo (proveniente de Sho, que significa sombra en japonés) presente en mamíferos y otros vertebrados (Véase la Fig. 5).



Figura 8. Estructura de Shadoo. Esta proteína presenta un alto grado de homología con PrP^C en la corta región elástica N-terminal de PrP^C. (Tomada y modificada de Mehrpour M, et al. 2010. [17]).

Los análisis de patrones de expresión de *SPRN* muestran que la expresión está restringida al cerebro, sugiriendo que la Shadoo puede estar asociada a fenómenos en el SNC. [76]

Ha sido demostrado que Shadoo comparte propiedades neuroprotectoras con PrP^C, y se estableció que las funciones de Shadoo contrarrestan los efectos neurotóxicos de Doppel. Se ha observado que la expresión de Shadoo es disminuida después de la formación de PrP^{Sc}, lo cual puede también disminuir la neuroprotección y potenciar el desarrollo de la enfermedad en una hipótesis de pérdida de función de PrP^C como lo muestra la Figura 9. Esta proteína cobra relevancia en las enfermedades priónicas dadas sus propiedades de neuroprotección y que se ha asociado a CJD la nulidad de *SPRN*. [28] Además, el gen *SPRN*, está más conservado a través de los vertebrados que *PRND* o *PRNP*. [16]

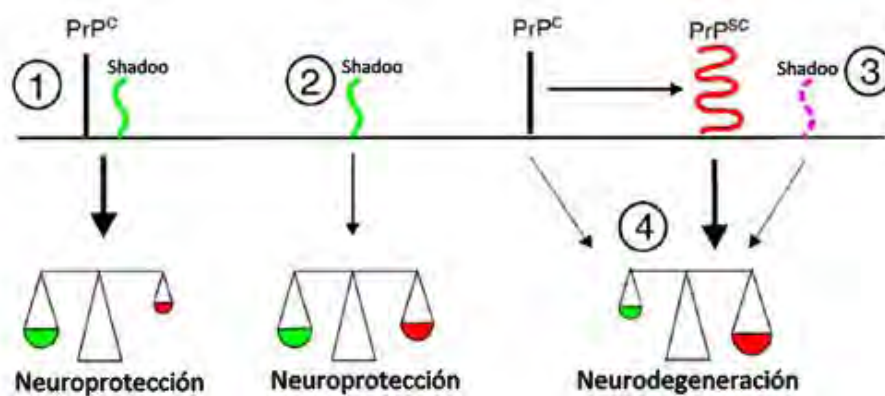


Figura 9. Modelo propuesto de interacción entre Shadoo y PrP^C. El modelo supone que Shadoo y PrP^C interactúan con un mismo receptor, teniendo PrP^C más afinidad. En presencia de ambas se produce neuroprotección al poseer PrP^C esta propiedad. En ausencia de PrP^C Shadoo puede compensar el efecto de neuroprotección aunque no en la misma magnitud. Cuando PrP^C es convertida en PrP^{Sc}, esta pierde su propiedad neuroprotectora ocupando los receptores y los niveles de expresión de Shadoo disminuyen, conllevando a la neurodegeneración. (Tomada y traducida de Nicolas O, et al, 2009. [28]).

3.7 Localización de la proteína prión

La PrP^C se encuentra distribuida en prácticamente todos los tejidos del organismo humano y mamíferos analizados, sin embargo, los perfiles de expresión más altos del gen *PRNP* se presentan en el SNC, siguiéndole el sistema linfático en conjunto (véase la Figura 10). El deterioro de los tejidos afectados y los síntomas consecuentes en las enfermedades priónicas es explicado por la distribución de ésta proteína en ellos, sobre todo a nivel cerebral. [17,28,77,78]

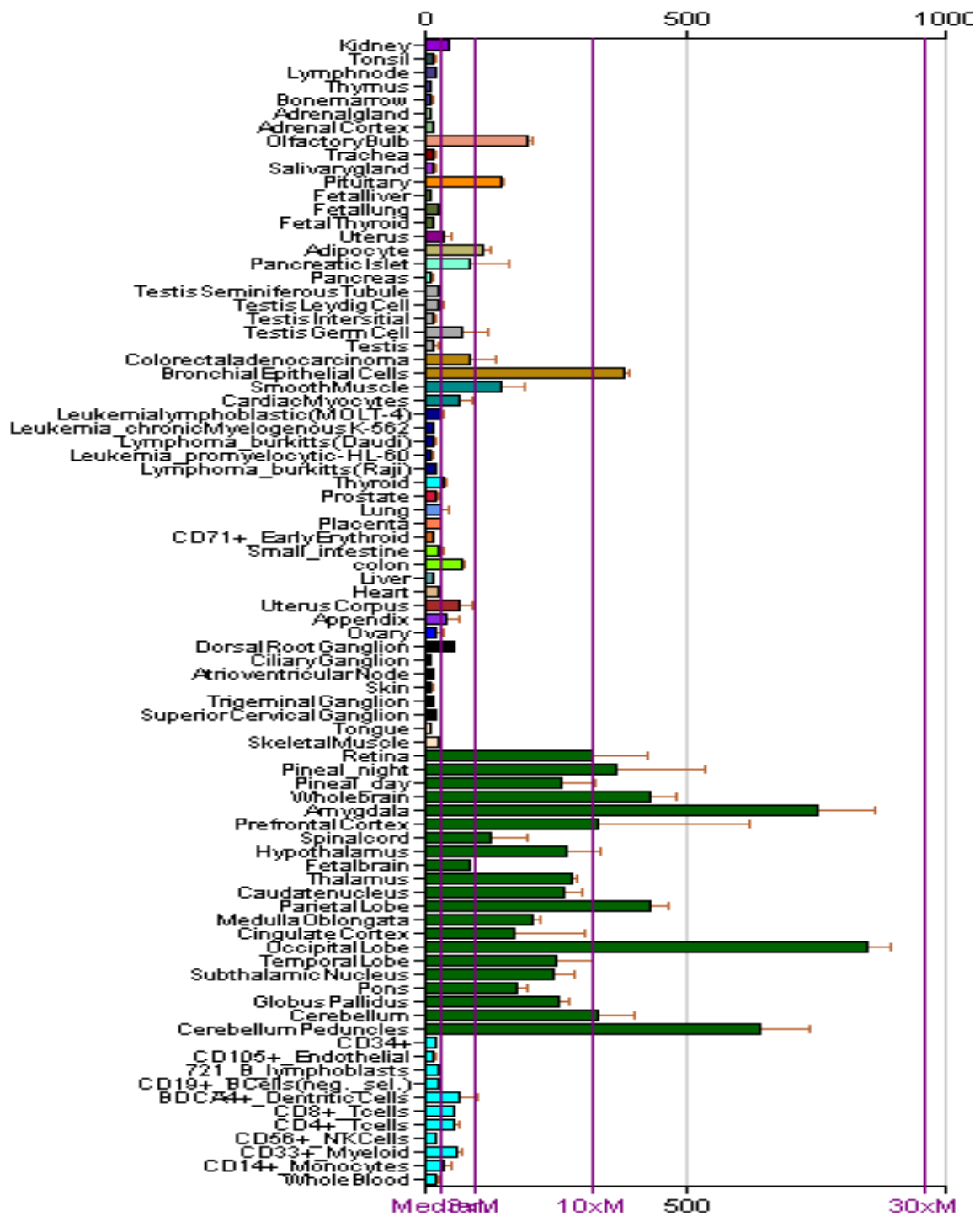


Figura 10. Expresión del gen *PRNP* en el cuerpo humano. La expresión más alta se encuentra en el SNC, siguiéndole las células del sistema inmune. Dentro del SNC, destaca el nivel de expresión en la amígdala, siguiéndola la corteza prefrontal. Tomada de Su A, et al, 2004. [77]).

A nivel celular, *PRNP* se expresa en varias poblaciones neuronales del hipocampo, tálamo, neocorteza y células gliales. [77, 79,80] En neuronas, la PrP^C predomina en los axones y dendritas, así como en la superficie de vesículas sinápticas y compartimentos endosomales. [77,17,28]

3.8 Funciones de la proteína prión

Hasta el momento, no se conoce una función específica de la proteína prión, sin embargo, numerosos experimentos plantean su interacción con otras moléculas y demuestran que su ausencia o cambio estructural produce cambios importantes a nivel celular, tal como lo muestra la Figura 11.



Figura 11. Principales cambios consecuentes a la transformación de PrP^C en PrP^{Sc}.

La pérdida de función de PrP^C por la presencia de PrP^{Sc} conlleva a cambios en la actividad SOD, en la respuesta a estrés y en la regulación del cobre entre otras consecuencias.

(Tomada y traducida de Brown D, 2001) [81]

3.8.1 Ligandos de PrP^C y señalización intracelular

Se han descrito muchas interacciones de la PrP^C con otras moléculas por co-inmunoprecipitación, entre ellas se encuentran Hsp60, ST11, Bcl-2 y Grb2. [28,82,83]

Dos de las interacciones más estudiadas y relevantes de la PrP^C son la unión de PrP^C al receptor de precursor del receptor de laminina 67k y a la molécula de adhesión N-CAM, en ambos casos contribuyendo a la transducción de señales vitales o promoviendo el crecimiento neuronal. Además, PrP^C regula la neuritogénesis en una manera mediada por laminina, sugiriendo que la interacción PrP^C -laminina es relevante para el desarrollo y mecanismos de plasticidad relacionados. [84,85]

3.8.2 PrP^C en la regulación del ciclo celular y diferenciación

Existe controversia sobre el papel de la proteína prión en la regulación del ciclo celular. Por una parte, autores afirman que la expresión de PrP^C conlleva a la proliferación celular linfocítica o promueve el recambio celular hematopoyético humano. [86] Y que además, la PrP^C es altamente expresada durante la fase G1 en líneas celulares humanas de glioblastoma y otro tipo de tumores.[17,87]

Por otro lado, algunos autores sugieren que la expresión de PrP en G1 se relaciona con un arresto en el crecimiento y la diferenciación terminal celular. [88] Sin embargo, la primera hipótesis muestra más evidencias a su favor.

A nivel de SNC, se ha comprobado que la PrP^C actúa como un “inductor” intrínseco con propiedades proliferantes de células en nicho neuronal, probablemente al formar parte de un complejo neurotrófico.[17]

3.8.3 Regulación por cobre

La región de repeticiones de octapéptidos de la PrP tiene la capacidad de unirse a iones metálicos como el Cu²⁺, Cu⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ y Mn²⁺. [89] El ión unido con mayor frecuencia es Cu²⁺, siguiéndole Cu⁺, por lo cual esta proteína está involucrada en la regulación celular de este ión.[17,89] Fracciones de sinaptosoma han revelado que la cantidad de cobre en el cerebro de ratones knockout es menor que en los silvestres, aunque existe controversia al respecto.[17]

A través de la unión a Cu²⁺, la PrP^C puede participar en el flujo del calcio y el estado redox de la terminal presináptica, de tal manera que al modificar el estado redox se ve facilitada la neurotransmisión. Además, la unión PrP^C-Cu²⁺ *in vitro* promueve la endocitosis mediada por la proteína clatrina, por lo cual podría estar involucrada en la actividad de otros receptores en la membrana plasmática. [17,28,90]

La región de repeticiones de octapéptidos puede también unirse a oligómeros de proteína β-amiloide, promoviendo su endocitosis y provocando así neurotoxicidad, este es otro de los motivos por el cual el cobre es considerado como un regulador de la homeostasis celular neuronal en conjunto con la PrP^C. [28,91]

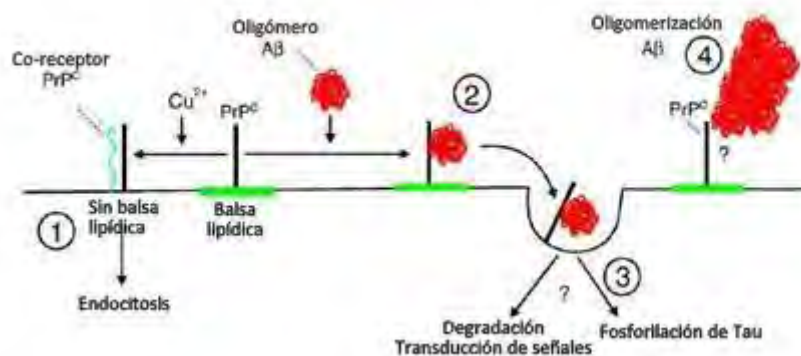


Figura 12. Modelo de interacción de PrP^C con oligómeros de proteína β-amiloide.

1) Tráfico normal de PrP^C de balsas lipídicas al interactuar con Cu²⁺ y un supuesto co-receptor. 2,3) La asociación de PrP^C a oligómeros β-amiloide impide la interacción con el co-receptor endocitando el oligómero, las consecuencias de esto son desconocidas. 4) Por otra parte, la unión de PrP^C a oligómeros puede potenciar la formación de depósitos β-amiloide. (Tomada y traducida de Nicolas O, 2009. [28]).

Células que carecen de PrP^C podrían compensar la ausencia de PrP^C usando otras proteínas captadoras de cobre, como las proteínas receptoras de transportadores de cobre (CTR). [81]

3.8.4 Sinapsis y desarrollo neuronal

La PrP^C tiene un papel importante en la sinapsis y el desarrollo neuronal. Se ha comprobado que la PrP^C interactúa con la sinapsina, y que la PrP^C está presente en fracciones de sinaptosoma. [92] La razón de la alta expresión de PrP^C en la sinapsis puede ser por la necesidad de proteger la sinapsis de daño oxidativo (dado que PrP^C posee propiedades antioxidantes como se verá más adelante).[81]

Por otra parte, ha sido demostrado que *Prnp* se sobreexpresa en neuronas durante el crecimiento celular, la diferenciación celular neuronal y la regeneración axonal. Además, entre los experimentos realizados, se comprobó la interacción de la proteína inducible de estrés 1 (ST11) con PrP en cultivos neuronales de hipocampo, induciendo respuestas tales como neuroprotección o neuritogénesis. [81,93]

3.8.5 Actividad antioxidante

Cultivos neuronales revelaron que la PrP^C modula el estrés oxidativo a través de regular la actividad de la superóxido dismutasa-1 (SOD-1) en una manera

dependiente de cobre. [94] Experimentos usando PrP^C recombinante y PrP^C inmunoprecipitada han postulado una actividad SOD como propiedad intrínseca de la proteína PrP^C, aunque no existe la seguridad de que esto ocurra *in vivo*. [95,96]

3.8.6 Función en el sistema inmune

La PrP^C es expresada en linfocitos T y células presentadoras de antígeno principalmente. Dentro de este último grupo, la célula dendrítica es la que presenta los niveles más altos de PrP^C, y es importante destacar que ésta es la célula más potente en la presentación de antígeno. [89] Observaciones experimentales muestran que la ausencia de PrP^C en linfocitos T no presenta grandes repercusiones, mientras que la ausencia de la PrP^C en células dendríticas conllevó a una respuesta significativamente disminuida por parte de las células T en la presentación de antígeno. [97] Otras observaciones sugieren que la PrP esta implicada en el desarrollo, activación y proliferación de la célula T. [86]

En cuanto a la muerte celular programada, o apoptosis, muchos autores concuerdan en que la PrP^C podría tener una función antiapoptótica, esto como consecuencia de la alta similitud de Bcl-2 (molécula antiapoptótica) con la región BH2 de PrP^C y a su alta expresión en tejidos con cáncer. [17]

3.8.7 PrP^C y otras enfermedades

Durante muchos años, estudios han mostrado por diferentes métodos una supuesta relación entre las prionopatías y la enfermedad de Alzheimer dado que en la misma placa amiloide en pacientes con CJD o GSShan sido encontrados PrP^{Sc} y proteína β -amiloide. [98,28] Los autores proponen que la PrP^C es un mediador de la disfunción sináptica inducida por oligómeros de proteína β -amiloide. Es bien sabido que PrP^C se une a fibrillas amiloides, como se mostró en la Figura 12, pero se requieren aún más estudios para plantear y dar continuidad a esta relación. [91]

3.9 Modelos animales

A inicio de los años 90 se generaron los primeros tipos de ratones knockout, pero sorprendentemente ninguno de ellos mostraba defectos fenotípicos principales. Esto llamó la atención de más grupos de investigación generando nuevos modelos animales.

La generación de ratones carentes de PrP^C implicó un refuerzo de la “hipótesis única de proteínas” propuesta por Stanley Prusiner en 1982, ya que los ratones *knockout* mostraban resistencia a la infección de la proteína prión. [64]

En general, los efectos observados a largo plazo incluyeron déficit en la transmisión sináptica, incremento en la sensibilidad a estrés oxidante, incremento en la susceptibilidad a la excitotoxicidad de glutamato, alteraciones en el ciclo circadiano, déficit cognitivo, muerte selectiva de células de Purkinje, ataxia progresiva cerebelar asociada y sobreexpresión de *PRND*. [28,99,100]

Los efectos más devastadores son observados en ratones mutados carentes de la región central del dominio globular (incluyendo algunos residuos de región hidrofóbica) de la PrP^C, esto debido a que la región hidrofóbica está involucrada en la regulación del retículo endoplásmico y su ausencia promueve la degeneración celular. [28]

Entre los principales descubrimientos a partir de estos experimentos, se tiene el hallazgo de Doppel, y por otra parte, el planteamiento de que una proteína tipo PrP^C, llamada “ π ”, se unía a un ligando común para PrP^C, compitiendo ambas por el mismo ligando pero teniendo π menor afinidad, de tal manera que π reemplazaba parcialmente las funciones fisiológicas de PrP^C. [28,101] Esta hipótesis explicaría el porqué los ratones carentes de PrP^C no muestran degeneración neuronal severa. Posteriormente se planteó que ésta proteína “ π ” podría ser Shadoo. [101]

Además, estudios en estos modelos mostraron que la presencia de proteína prión normal revierte los efectos neurotóxicos de proteínas prión truncadas o Doppel, lo cual apunta hacia un mecanismo de toxicidad mediado también por ligandos. [28]

3.10 Modelo de interacción PrP^C-PrP^{Sc}

El mecanismo de replicación de la PrP^{Sc} es único en la biología. Hay evidencia que apoya la Teoría de Prusiner, que sugiere que la enfermedad priónica es causada sólo por la proteína π y que la proteína PrP^{Sc} dirige su replicación y propagación tomando ventaja de la alta similitud con la proteína huésped, actuando la PrP^{Sc} como un templado sobre el cual la PrP^C es nuevamente plegada. [28,23]

Algunos autores sugieren que la PrP^{Sc} no es tóxica per se, sino que la toxicidad proviene de la acumulación de PrP^C en el citosol. Esta acumulación podría ser consecuencia de ya sea un defecto primario en el plegamiento o un defecto en el metabolismo fisiológico, principalmente en el sistema ubiquitina-proteasoma. En estas condiciones, una reducción en la actividad UP, la cual normalmente remueve la PrP^C citosólica, puede sostener el proceso de acumulación y deposición de moléculas de PrP^C alteradas. Alternativamente, una actividad anormal del UP podría ser abrumada por un exceso de sustrato. Altos niveles de PrP^C en el citosol pueden conllevar a un deterioro del tráfico de la proteína el cual no permite que la PrP^C alcance su sitio apropiado en la membrana celular. [35]

A nivel de proteínas, proteínas mutadas parecen ser capaces de plegarse en un número de diferentes conformaciones patológicas. Esta diversidad puede ser en parte consecuencia de la estructura PrP^C primaria; a esta hipótesis se le conoce como de “selección de conformación”. [102]

El mecanismo de formación y estructura de PrP^{Sc} aun es desconocido, pero es evidente un cambio hacia una estructura más β -plegada y menos α -hélice como se observa en la Figura 13.

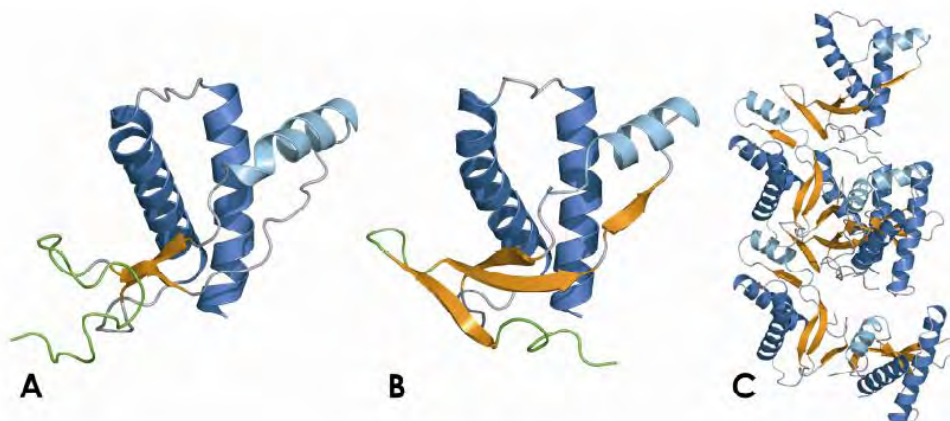
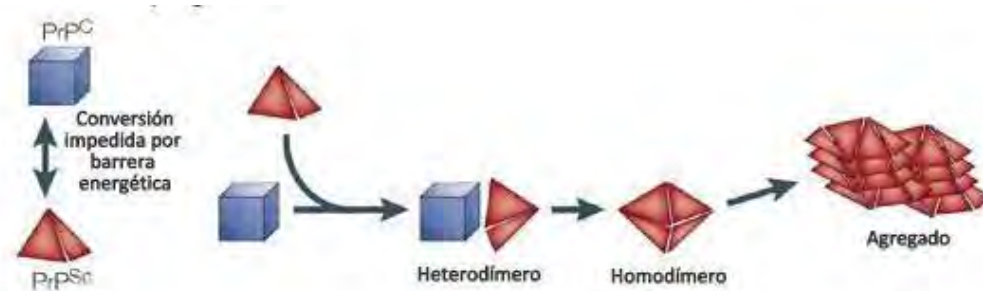


Figura 13. Estructura tridimensional de la PrP^C, PrP^{Sc} y una protofibrilla de PrP^{Sc}. A) Estructura de la PrP^C obtenida por RMN a pH de 4.5. B) Estructura de una PrP^{Sc} obtenida por simulación. C) Modelo propuesto de una protofibrilla de PrP^{Sc} consistiendo de moléculas idénticas a la mostrada en B. (Tomada de Van der Kamp M, et al, 2009. [27]).

Actualmente, los modelos más aceptados para explicar la formación de PrP^{Sc} son el de replegado y el de la semilla, teniendo más aceptación éste último.

En el modelo de replegado, el evento comienza por la interacción entre la proteína prión anormal PrP^{Sc} introducida y la proteína prión normal PrP^{C} . En este modelo, la conversión espontánea de la PrP^{C} en PrP^{Sc} la impide una barrera energética. La unión de las dos proteínas forma un heterodímero, que provoca la formación de la proteína normal en anormal, resultando finalmente en un homodímero. La ruptura del homodímero conduce a la liberación de los dos elementos, de manera que las proteínas PrP^{Sc} se unen nuevamente con una PrP^{C} . Así el ciclo se perpetúa, transformando poco a poco una multitud de PrP^{C} en PrP^{Sc} . Estas moléculas mal plegadas se unen a homomultímeros en forma de bastoncillos, similares a las placas amiloides como lo muestra la Figura 14. [103,104]

Figura 14. Modelo de replegamiento. (Tomada y traducida de Aguzzi, et al, 2001. [104]).



En el modelo de la semilla, existe un equilibrio termodinámico estable entre la PrP^{C} y la PrP^{Sc} . Únicamente si varias PrP^{Sc} forman una semilla bien ordenada, que sirva como semillero infeccioso (proceso lento), otras PrP^{Sc} pueden reclutarse y, por fin, agregarse en una estructura tipo amiloide como lo muestra la Figura 15.[103,104]

Figura 15. Modelo de la semilla. (Tomada y traducida de Aguzzi, et al, 2001. [104]).



Debido a la insolubilidad que caracteriza a las moléculas de PrP^{Sc}, éstas se depositan en el citoplasma neuronal, formando extensos agregados tóxicos para la célula que pueden crear fibrillas. [99,100]

3.11 Enfermedades priónicas en el humano

Las enfermedades priónicas constituyen un grupo de padecimientos neurodegenerativos fatales, que afectan a humanos y animales. Estas enfermedades, también conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (TES), son una causa frecuente de demencia de rápida evolución e inicio temprano. La causa de estas enfermedades es la presencia y acumulación de la PrP^{Sc} en el sistema nervioso central principalmente.

Estas enfermedades pueden ser clasificados con base en su etiología como esporádicas, adquiridas o heredadas. [35,105]

Las enfermedades causadas por priones incluyen la enfermedad de Creutzfeldt Jakob, la enfermedad de Gerstmann Sträussler Scheinker, el Insomnio Familiar Fatal y el kuru. Además de estos padecimientos, otros como la enfermedad de Huntington tipo 1 (HDL-1) o enfermedades asociadas a defectos en la glicosilación de la proteína prión también han sido considerados como enfermedades priónicas, sin embargo, el número de casos reportados es muy limitado y en el caso de la HDL-1, ésta ha sido categorizada como enfermedad de GSS.[105,106]

Este conjunto de enfermedades muestran una serie de síntomas muy similares entre sí, entre los que se incluyen: ataxia, temblor generalizado, pérdida de coordinación, alteraciones de la memoria, disfunción motora, pérdida de las habilidades cognitivas, disartria, mioclonía, síntomas siquiátricos, demencia progresiva e invariablemente la muerte.[107]

Las características neuropatológicas son también similares entre enfermedades e incluyen: pérdida neuronal que le confiere al cerebro un aspecto espongiforme; formación anómala de gran cantidad de vacuolas intraneuronales de 20-200 µm de diámetro; presencia de cúmulos de células de la glía y astrocitos; ausencia de reacción inflamatoria y acumulación de depósitos de la proteína prión anómala. [107]

La presencia y magnitud de estas características varían en cada tipo de enfermedad, como lo muestra la Figura 16.

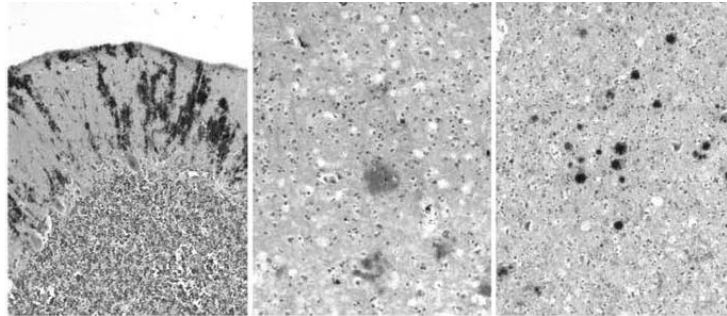


Figura 16. Características histopatológicas de las enfermedades priónicas heredables.

La primera imagen corresponde a fCJD, la segunda a IFF y la tercera a la enfermedad de GSS. La fCJD presenta pérdida neuronal cortical, espongiosis, gliosis y depósitos variables de PrP. En el IFF se presentan cambios espongiiformes y depósitos de PrP^{Sc} difusos. En la enfermedad de GSS se presentan múltiples placas unicéntricas de deposición de PrP^{Sc}. (Tomada de Mead S, 2006. [23]).

Una cuenta epidemiológica general de enfermedades priónicas heredables (EPH) es problemática, dado que hay una variación geográfica considerable en la incidencia de éstas relacionada a los efectos genéticos de deriva y migración en la población. Además, una incidencia exacta es difícil a causa del diagnóstico tan complejo de las enfermedades causadas por priones; un estudio sobre autopsias reveló que 40% de los casos de enfermedades priónicas no fueron diagnosticados en vida. [23]

Datos provenientes de 492 casos de EPHs a nivel mundial sobre la edad de inicio y duración de la enfermedad se resumen en las siguientes Figura 17.

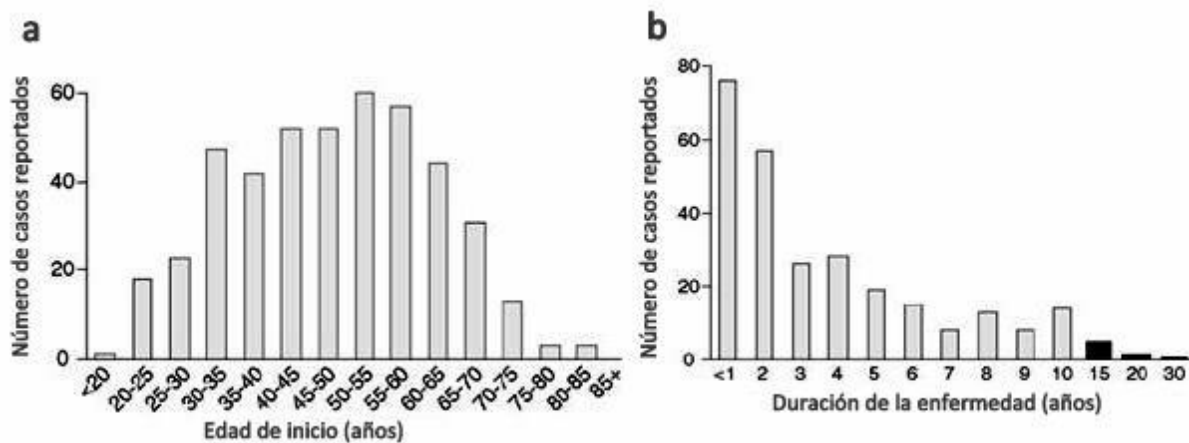


Figura 17. Edad de inicio y duración de la enfermedad. La gráfica (a) muestra la edad de inicio de 492 casos reportados de EPHs. La gráfica (b) muestra la duración de la enfermedad en estos casos (el número 15 en el eje x incluye la duración de la enfermedad en el rango de 11 a 15 años, el 20 incluye el rango de 16 a 20 y el 30 incluye de 20 a 30 años o más). (Tomada de Mead S, 2006. [23]).

3.11.1 Diagnóstico de las enfermedades priónicas

El diagnóstico de las enfermedades causadas por priones es complicado dado que los síntomas se sobrelapan considerablemente. [23]

El diagnóstico de las enfermedades priónicas debe considerar:

- Características clínicas
- Resultados neuropatológicos
- Historial familiar
- Secuencia del gen *PRNP*

Además debe apoyarse en electroencefalogramas (EEG), imágenes cerebrales y análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR), pero ninguno de estos es capaz de precisar el diagnóstico por sí solo.

- Electroencefalograma: Hallazgos de EEG característicos de complejos de ondas agudas periódicas (PSWCs), consistiendo de ondas trifásicas cada 0.5 a 2.0 segundos, pueden sugerir el diagnóstico de una enfermedad priónica.

Aunque PSWCs son observadas en un porcentaje relativamente pequeño de individuos con enfermedades priónicas genéticas, su presencia parece ser altamente dependiente de mutaciones causantes asociadas y el fenotipo clínico resultante. Inicialmente las PSWCs pueden ser unilaterales, pero con progresión de la enfermedad, ellas se esparcen a ambos hemisferios. En los últimos estadios de la enfermedad, la actividad periódica puede desaparecer.[108,109]

- Imagenología:

- Imagen de Resonancia magnética: Muestra atrofia generalizada leve a moderada al momento de la presentación o dentro de un intervalo corto después de la presentación. Se puede mostrar hiperintensidad de los ganglios basales.
- MRI de Difusión-Cargada (DWI): Parece ser más sensible y específico. Se pueden observar señales de hiperintensidad aisladas.
- Escaneo PET o SPECT: con la excepción de FFI, parece ser limitado al diagnóstico de enfermedades priónicas genéticas.[105,109]

- Líquido Cefalorraquídeo: Se presenta una elevación en la concentración de la proteína 14-3-3 en el LCR. El análisis de la proteína 14-3-3 tiene la más alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico pre-mortem de sCJD, pero puede ser encontrada también en LCR de pacientes con otras enfermedades neurológicas.[110,111] La proteína 14-3-3 se encuentra en altas concentraciones dentro de células neuronales y esta involucrada en la transducción de señales, la regulación del ciclo celular y la apoptosis.[110,111] Esta proteína es liberada al LCR como consecuencia de la destrucción rápida y extensa del tejido cerebral y los métodos más utilizados para su determinación son el Western blot y el ELISA.[105,110,111]

No hay un tratamiento que pueda curar o controlar las enfermedades priónicas. Múltiples sustancias (incluyendo compuestos polianiónicos, rojo Congo, anfotericina B, porfirina y derivados de fenotiazidas) y tratamientos inmunológicos han sido probados sin tener éxito, en el mejor de los casos (con el uso de polisulfato de pentosán y la anfotericina), se retarda el inicio clínico si es detectada la infección a

tiempo. Comúnmente, sólo se intenta contrarrestar los síntomas, previendo que los fármacos administrados no resulten con efectos opuestos al esperado. [105,112]

3.11.2 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD)

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob fue descrita por primera vez en 1920 por los neurólogos alemanes Hans Gerhard Creutzfeldt y Alfons Maria Jakob. Esta enfermedad está distribuida aleatoriamente en todo el mundo con una incidencia anual de 0.5 a 1.0 casos por millón en la población. La edad de inicio promedio es de entre 55 y 57 años y alrededor de un 10-15% de los casos totales de CJD son causadas por mutaciones en el gen *PRNP*, mientras que casi el 85% se presentan de manera esporádica y alrededor del 1% como forma adquirida.[23] Comparte los signos y síntomas típicos clásicos de las enfermedades priónicas, los cuales presentan ligeros cambios dependiendo del tipo de CJD presente.

Esta enfermedad ha sido clasificada en base a su etiología y características clínicas como:

- Enfermedad de Creutzfeldt Jakob familiar
- Enfermedad de Creutzfeldt Jakob esporádica
- Enfermedad de Creutzfeldt iatrogénica
- Variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob
- Variante Heidenhein de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob

3.11.2.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (fCJD)

La concurrencia familiar de enfermedades priónicas es debida a mutaciones en el gen *PRNP*, las cuales se heredan de manera autosómico dominante.[23]

Los síntomas se presentan en promedio entre los 50 y 60 años de edad, y se tiene una duración de la enfermedad menor a un año antes de la muerte en la mayoría de los casos. [23]

En un inicio, se presenta confusión progresiva y deterioro de la memoria, seguido de ataxia y mioclonías. Otros síntomas neurológicos reportados incluyen debilidad, rigidez, bradicinesia, temblor, corea, deterioro visual y convulsiones. Las

características psiquiátricas reportadas incluyen delirios y alucinaciones y en los últimos estadios de la enfermedad, el paciente presenta inmovilidad, mutismo, y sacudidas mioclónicas. [23,105]

3.11.2.2 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD)

Como se mencionó previamente, la enfermedad de Creutzfeldt Jakob esporádica (sCJD) es la más frecuente de las TSEs. En este tipo de enfermedad, no se tienen factores de riesgo conocidos, como es el caso de la CJD iatrogénica, ni un fondo genético sugestivo. La sCJD muestra un efecto de susceptibilidad en los codones 129, siendo más susceptibles los individuos homocigotos 129M o 129V. [23,113]

Los síntomas presentes son similares a los de la fCJD. [113]

3.11.2.3 Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

La variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es atribuida a la ingesta de carne bovina contaminada, carne proveniente de un animal con encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), comúnmente conocida como enfermedad de las vacas locas.[111] El curso clínico comienza con cambios en el comportamiento (apatía o depresión) y/o dolor en las extremidades, posteriormente se presenta demencia progresiva con ataxia y mioclonía. El curso de la enfermedad es de aproximadamente 1.5 años. [23,114,115]

La vCJD afecta pacientes más jóvenes y tiene un curso clínico más prolongado que la sCJD, como se muestra en la Figura 18.

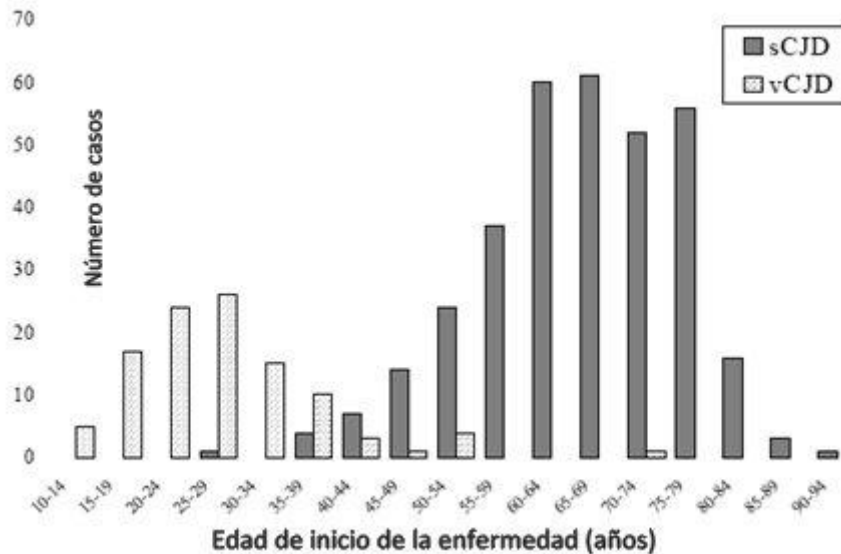


Figura 18. Edad de inicio de sCJD y vCJD. Es notable el inicio más temprano en pacientes con sCJD. (Tomada y traducida de World Health Organization. [114]).

En este tipo de CJD, el electroencefalograma es frecuentemente difuso más que periódico y la proteína 14-3-3 es detectada sólo en el 50% de los pacientes, por lo cual no son la herramienta más certera en el diagnóstico.[115] Análisis histopatológicos revelan cambios espongiiformes distribuidos de manera difusa a lo largo del cerebro y deposición de placas amiloides densas rodeadas por un halo de vacuolización descrito como “placas floridas”. [116]

El diagnóstico de la vCJD está constituido de los mismos criterios que el resto de las enfermedades priónicas. Sin embargo, en el caso particular de esta enfermedad, la OMS ha planteado una serie de parámetros para el diagnóstico y clasificación de esta enfermedad, los cuales se muestran en la tabla.

Tabla 3. Clasificación de la CJD en el diagnóstico [114].

| Definición de subtipos de CJD en el diagnóstico de acuerdo a la OMS | |
|---|---|
| Definitivo | Diagnosticado por técnicas neuropatológicas estándar; y/o inmunocitoquímicamente y/o PrP resistente a proteasas confirmada por Western blot y/o presencia de fibrillas asociadas a scrapie. |
| Probable | Demencia progresiva; y al menos dos de las siguientes características clínicas: <ul style="list-style-type: none"> • Mioclonía |

- Deterioro cerebelar o visual
- Disfunción piramidal/extrapiramidal
- Mutismo acinético
- EEG típico y/o ensayo positivo de 14-3-3 en LCR y duración clínica menor a dos años
- Investigaciones de rutina no deben sugerir diagnósticos alternos

Posible

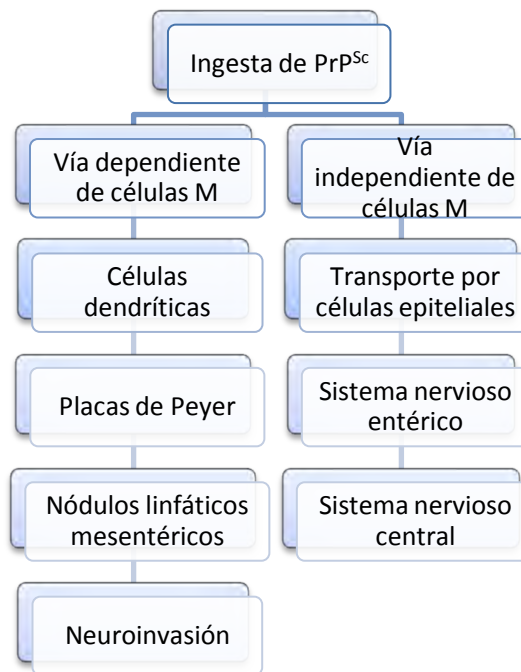
Al menos dos de las siguientes características clínicas:

- Mioclonía
- Deterioro visual o cerebelar
- Disfunción piramidal o extrapiramidal
- Mutismo acinético
- EEG atípico
- Duración menor a dos años

Los casos de vCJD reportados provienen del Reino Unido, Eslovaquia y Francia principalmente. Como se mencionó anteriormente, los casos reportados para vCJD genotipificados han sido homocigotos para el alelo met129 del gen *PRNP*. [23,117]

Las rutas de entrada e invasión y propagación de PrP^{Sc} propuestas se basan en estudios que han mostrado por una parte, que la PrP^C es capaz de unirse a receptores como el precursor del receptor de la laminina, y por otra, que la proteína prión puede ser transportada por las células M a las placas de Peyer. Dados estos argumentos y su hallazgo en sitios específicos, se han propuesto dos mecanismos de entrada e invasión de la PrP^{Sc} (véase Fig. 19) sin embargo se necesita más evidencia sobre estos. [118]

Figura 19. Mecanismos propuestos de entrada e invasión de la PrP^{Sc} en la vCJD. [118]



3.11.2.4 Variante Heidenhain de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob

En 1928, Heidenhain reportó una variante de sCJD en la cual pacientes presentaban síntomas prominentes visuales tempranamente. Desde entonces, el término 'variante Heidenhain' ha sido utilizado para hacer referencia a casos en los cuales los síntomas visuales ocurren junto con otras características de CJD. [119] La edad media de inicio fue reportada es de 67 años y la duración de la enfermedad de cuatro meses. Pacientes con esta variante referían decremento en la agudeza visual, visión borrosa, distorsiones visuales, defecto del campo visual periférico y defectos en la visión a color. Posteriormente desarrollaron los signos y síntomas clásicos de la CJD. Todos los pacientes eran homocigotos para 129M. [119] Además, la variante Heidenhain de CJD esta caracterizada por hiperintensidades pronunciadas en los lóbulos occipitales en resonancias magnéticas.[120]

3.11.2.5 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iCJD)

Este tipo de CJD es causada por la transmisión de PrP^{Sc} humano-humano a través de inyecciones de hormona del crecimiento derivadas de cadáveres, el uso de dura madre en neurocirugía, el trasplante de córnea o los electrodos intracerebrales contaminados. [107]

Se presenta con los síntomas clásicos de CJD, dependiendo del origen biológico de la PrP^{Sc}. Los factores que influyen en el periodo de incubación son la ruta de inoculación (en el cerebro es la más corta), dosis, linaje de prión y especie de la cual fue obtenida el inoculo, e importantemente, el fondo genético del receptor.[121] Pacientes con genotipo heterocigoto en el codón 129 muestran una edad de inicio más tardía y cierto grado de protección con respecto a pacientes homocigotos.[122]

3.11.3 Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

Esta enfermedad, descrita por primera vez por el neurólogo J. Gerstmann y los neuropatólogos Sträussler y Scheinker, es una rara enfermedad priónica asociada a mutaciones en el gen *PRNP* con patrón de herencia autosómico dominante.[4] La mutación P102L, es la mutación más frecuentemente encontrada en pacientes con GSS.[23]

Esta enfermedad se caracteriza por presentarse en la edad adulta, cursando con pérdida de la memoria, demencia, ataxia progresiva de las extremidades y troncal, disartria y deterioro cognitivo en la tercera y cuarta década de la vida. Además de éstos, se han reportado otros síntomas tales como cambios en la personalidad, pérdida de la visión y pérdida de sensibilidad. En los últimos estadios se presenta demencia, psicosis y /o depresión severa con pérdida de peso. [23,123]

La enfermedad de GSS puede ser distinguida de CJD por la edad de inicio, la larga duración de la enfermedad y la ataxia cerebelar prominente.

Histopatológicamente la enfermedad de GSS se ha caracterizado por deposición de placas grandes distribuidas a lo largo de la corteza cerebral, ganglios basales y materia blanca. [123] Se ha encontrado también degeneración del tracto corticoespinal, el tracto espinocerebelar y la columna dorsal.[124]

La edad inicio de la enfermedad varía entre publicaciones, coincidiendo en un rango de 40 a 70 años, con una duración de 5 meses a 17 años. [23,105]

Se ha notado que pacientes heterocigotos para el polimorfismo M129V del gen *PRNP* tienen una edad de inicio más tardía que aquellos homocigotos para ya sea metionina o valina. [23,125]

3.11.4 Insomnio Familiar Fatal

El insomnio familiar fatal es una enfermedad priónica rara descrita por primera vez en familias finlandesas. Se presenta en el humano como consecuencia de la mutación puntual D178N en el gen *PRNP* con patrón de herencia autosómico dominante. [126] En 1992 se estableció una relación haplotípica entre el codón 129 y 178, donde la mutación D178N en un cromosoma 129M conlleva a FFI, mientras que la mutación en un cromosoma 129V conlleva a CJD. [23,127]

Clínicamente se caracteriza por un desorden en el ciclo sueño/alerta (insomnio progresivo intratable), alucinaciones, delirios, y disautonomía precediendo deterioración cognitiva y motora. [127-129]

Los cambios neuropatológicos típicos se presentan principalmente en el tálamo anterior y dorsomedial, donde hay una pérdida neuronal severa y astrogliosis. [126,127] El tálamo anterior y dorsomedial tiene un rol en la integración y expresión del sueño, funciones autonómicas y ritmo circadiano neuroendócrino, lo cual explica el cuadro clínico presente. [130]

En 72 casos estudiados, la edad media de inicio fue de 50 años (rango de 20-71) y la duración media fue de 11 meses (rango de 5 meses a 4 años). [23,126] Actualmente se han descrito casos en familias provenientes de China, Alemania, Francia, España y Japón. [126,128-132]

El FFI presenta un amplio espectro de síntomas, algunos otros reportados incluyen pirexia, sudoración, miosis y alteración de esfínteres, estado de ensueño, disartria, temblor y mioclonía. [130]

Existe además un solapamiento clínico y patológico considerable entre el FFI y la CJD. Aunado a esto, tenemos que se ha empezado a reconocer que perturbaciones autonómicas y del sueño pueden acompañar otras mutaciones. [23] Con base en dichos reportes, se ha planteado que el FFI y la CJD pueden ser vistos como extremos de un espectro fenotípico.[128]

De manera interesante, se ha descrito que tratamientos psiquiátricos incluyendo medicamentos y terapia electroconvulsiva empeoraron el curso de la enfermedad. [133]

3.11.4.1 Insomnio familiar fatal esporádico

Se han reportado casos en los cuales un análisis riguroso del gen *PRNP* no mostró mutación en el codón 178, y posteriores experimentos con roedores mostraron que el FFI puede ser transmitido, definiendo este hallazgo como una forma esporádica de FFI, los afectados eran 129M. [134]

3.11.5 Kuru

La palabra kuru proviene de “kuria/guria”, que en lengua Fore significa temblor. El kuru es una enfermedad priónica que afectó a la etnia Fore de las tierras altas orientales de Papúa, Nueva Guinea. Esta enfermedad era transmitida por prácticas de canibalismo de cadáveres de parientes como muestra de duelo y respeto. La incidencia ha disminuido dramáticamente desde la suspensión del canibalismo en la década de 1950. Los hallazgos en la ruta de infección llevaron a hacer una relación del kuru con la vCJD. [6,135]

Los estudios en estos pacientes mostraron una fuerte relación entre la homocigosidad en el codón 129, ya sea para valina o metionina (particularmente metionina) con una edad de inicio más temprana y una duración más corta de la enfermedad, comparado contra un genotipo heterocigoto en este codón.[136] El hecho de tener una alta incidencia de la enfermedad, junto con el efecto de un inicio más tardío de la enfermedad en individuos heterocigotos en la edad reproductiva, permitió que se llevara a cabo una fuerte presión selectiva. Aunque algunos autores no están de acuerdo con esta teoría. [23,137]

Ratones transgénicos inoculados con kuru portando el alelo 129V de manera homocigota mostraron niveles de transmisión similares a aquellos de CJD clásica. La teoría más aceptada sobre el origen del kuru señala que esta enfermedad se originó probablemente por la ingesta de un individuo con sCJD. [23]

3.12 Enfermedades causadas por priones en animales

Las enfermedades priónicas presentes en animales han sido de suma relevancia en el descubrimiento y entendimiento de las enfermedades priónicas, especialmente en el caso del Scrapie y la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). La aparición de

estas dos enfermedades representa un riesgo potencial para el hombre al haber sido comprobada la transmisión de éstas al humano, y por otro lado, producir grandes pérdidas económicas. La Tabla 4 muestra las enfermedades priónicas reportadas en animales, las cuales han sido asociadas a la ingesta de alimento contaminado con PrP^{Sc}. [46,138,139]

Tabla 4. Enfermedades priónicas en animales. [46,138,139]

| Enfermedad | Especies afectadas | Signos clínicos | Características histopatológicas cerebrales |
|---|--|---|--|
| Scrapie | <ul style="list-style-type: none"> • Ovejas • Cabras | <ul style="list-style-type: none"> • Cambios en el comportamiento y en el temperamento. • Tendencia a rascar (de ahí el término de “scrapie”) • Pérdida de coordinación • Polidipsia. • Pérdida de peso. • Mordeduras en las patas • Temblor. • Convulsiones. | <ul style="list-style-type: none"> • Astrogliosis. • Vacuolización intracelular. • Pérdida neuronal. |
| Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) | <ul style="list-style-type: none"> • Bovinos | <ul style="list-style-type: none"> • Comportamiento agresivo • Hiperestesia • Descoordinación del paso | <ul style="list-style-type: none"> • Astrogliosis. Vacuolización intracelular. • Pérdida neuronal. • Placas amiloides ocasionales. |
| Encefalopatía transmisible del visón (TME) | <ul style="list-style-type: none"> • Visón | <ul style="list-style-type: none"> • Estado de excitación • Arqueo de cola • Descoordinación severa • Dificultades al caminar • Espasmos pronunciados de miembros traseros • Adormecimiento • Ausencia de respuesta a estímulos | <ul style="list-style-type: none"> • Astrogliosis. • Vacuolización intracelular. • Pérdida neuronal. |
| Enfermedad del desgaste crónico (CWD) | <ul style="list-style-type: none"> • Ciervo • Alce | <ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de peso progresiva. • Ataxia. • Deshidratación • Caída de cabeza y orejas • Salivación excesiva yafilamiento de dientes. • Poliuria. | <ul style="list-style-type: none"> • Lesiones en el cerebro y en la médula espinal con microcavitaciones de la sustancia gris. • Lesiones en el bulbo olfatorio, corteza, hipotálamo y núcleos vagales |

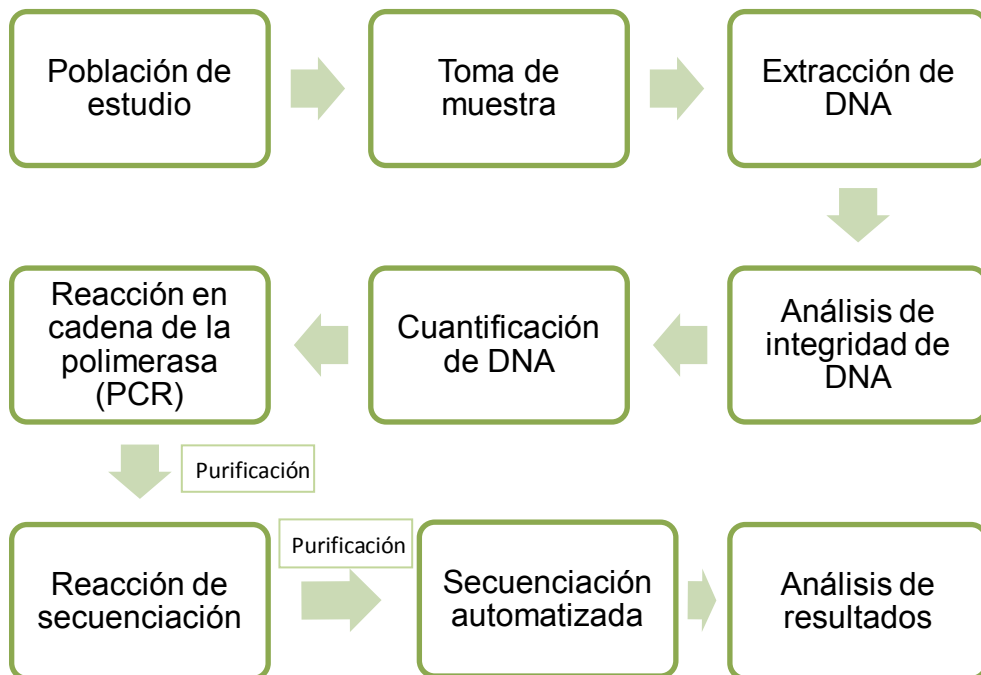
| | | | |
|---|--|---|--|
| | | | parasimpáticos. |
| Encefalopatía espongiforme felina (FSE). | <ul style="list-style-type: none"> • Gato doméstico • Puma • Ocelote • Tigre | <ul style="list-style-type: none"> • Temblor muscular generalizado • Ataxia • Dilatación pupilar | <ul style="list-style-type: none"> • Astrogliosis. • Pérdida neuronal. |

Una vez conocidos los principales aspectos de gen *PRNP*, la proteína que codifica y las enfermedades relacionadas, cabe recordar los objetivos planteados en el presente trabajo, que son identificar las mutaciones y polimorfismos presentes en el gen *PRNP* en pacientes mexicanos con demencia de rápida evolución y diagnóstico de probable enfermedad priónica, analizar la influencia del polimorfismo M129V como factor de riesgo en las enfermedades priónicas, y realizar una correlación genotipo – fenotipo de los pacientes estudiados.

IV. Diseño experimental.

La metodología general se plantea en la Figura 20. Los procedimientos de cada paso son explicados a detalle posteriormente.

Figura 20. Metodología general



4.1 Población de estudio

4.1.1 Pacientes

Se estudiaron 15 pacientes con demencia de rápida evolución atendidos en Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” en el periodo de octubre 2008 a octubre 2010; 8 mujeres y 7 hombres, de una edad promedio de 56.5 años (véase la Figura 21).

✿ Criterios de inclusión

Individuos con demencia de rápida evolución diagnosticados con probable enfermedad priónica.

✿ Criterios de exclusión

Individuos cuyo diagnóstico no fuera sugestivo de enfermedades priónicas.

4.1.2 Grupo control

Se utilizó como grupo control el obtenido por el mismo grupo de trabajo en el año 2008, que consta de 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 $46 \pm 2,5$ años.

☀ Criterios de inclusión

- ☉ Individuos sin antecedentes familiares de enfermedades neurológicas.
- ☉ Individuos procedentes de familias mexicanas por al menos dos generaciones.

☀ Criterios de exclusión

- ☉ Individuos con antecedentes familiares de enfermedades neurológicas.
- ☉ Individuos no procedentes de familias mexicanas por al menos dos generaciones.

4.2 Toma de muestra

Se realizó una venopunción para la toma de muestra de 6 mL de sangre periférica en un tubo vacutainer con ácido cítrico y dextrosa como anticoagulantes. Las muestras fueron preservadas a 4°C hasta el momento de su uso.

4.3 Extracción de DNA genómico

Extracción de DNA por el método de Sales-Cloroformo

1. Se transfirieron 3 mL de sangre a un tubo falcon de 15 mL y se agregó 3 veces el volumen igual de amortiguador TTS (Tris, tritón, sacarosa, pH=7.4). Se homogenizó por inversión. Se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 6 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante por decantación. Se agregó al botón 1 mL de amortiguador TTS, se disolvió el botón y se transfirió a un tubo de reacción de 1.5 mL.
2. Se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 2 minutos y se decantó. Este procedimiento se repitió hasta obtenerse un botón aparentemente libre de hemoglobina.
3. Se agregó al botón 570 μ L de NaCl 5 mM y se homogenizó. Posteriormente se agregaron 40 μ L de SDS al 10% y se homogenizó. Finalmente se agregaron 200 μ L de NaCl saturado (7 M) y se homogenizó. Se centrifugó a 13500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de reacción de 1.5 mL.

4. Se agregaron 700 μL de mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (proporción 98:2). Se homogenizó y centrifugó a 13500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de reacción de 1.5 mL.
5. Se añadieron 900 μL de etanol absoluto frío, se homogenizó y centrifugó a 13500 r.p.m. durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante por decantación. Se agregó al botón 700 μL de etanol al 70%. Se agitó y centrifugó a 13500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se secó en un concentrador al vacío durante aproximadamente 30 minutos.
6. Se resuspendió el botón en 250 μL de agua estéril y se mantuvo en agitación constante a 60°C durante 2 horas. La muestra de DNA obtenido se conservó a -20°C.

4.4 Cuantificación del DNA

Se realizó la determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 260 nm de las muestras de DNA extraído, así como la relación A_{260}/A_{280} para conocer la pureza de las mismas.

El equipo utilizado fue el AmpliQuant[®], en el cual se ajustó el blanco con agua inyectable y se eligió la opción de lectura de DNA de doble cadena. La celda utilizada se vació y lavó la para colocar 8 μL de la solución de DNA. Se cuantificó y obtuvo la pureza de la muestra eligiendo estas opciones en el aparato.

4.5 Análisis de integridad del DNA

Para llevar a cabo el análisis de integridad del DNA se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los pasos realizados para este análisis fueron:

✿ Elaboración del gel:

1. Se pesó 1g de agarosa por cada 100 mL de amortiguador TBE 0.5X (Tris-Boratos-EDTA).
2. La mezcla se calentó hasta formar una solución homogénea.
3. Se agregó 1 μL de bromuro de etidio por cada 100 mL de solución y se homogenizó.
4. Se depositó la mezcla anterior dentro de un molde y se colocaron los peines que forman los pozos en los que se carga la muestra.

5. Se dejó polimerizar por una hora y se retiraron los peines.

✿ Realización de la electroforesis:

1. Se colocó el gel sobre una cámara de electroforesis y se agregó amortiguador TBE 0.5X hasta cubrir por completo el gel o llegar a la marca especificada en la cámara.
2. Se tomaron 2.5 μL de muestra y se mezclaron con 2.0 μL de amortiguador de carga.
3. Se depositó la mezcla anterior sobre un pozo del gel, siguiendo el procedimiento para cada muestra.
4. Se tomó 1 μL de marcador de peso molecular y se depositó en un pozo adyacente a los de las muestras.
5. Se tapó y conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder. Se aplica un voltaje de 100 v durante aproximadamente 90 minutos.
6. Se colocó el gel en un transiluminador de luz UV y se tomó una fotografía para el uso práctico de la imagen obtenida.

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo la amplificación del segundo exón del gen *PRNP* utilizando oligonucleótidos que flanquearan a éste. La secuencia de estos oligonucleótidos se presenta entre los reactivos del anexo final.

La Tabla 5 muestra los reactivos utilizados en la PCR, así como la concentración y el volumen necesarios por reacción.

Tabla 5. Reactivos utilizados en la PCR

| Reactivo | Concentración | Volumen |
|----------------------------------|-----------------------|------------------|
| Primer Forward | 10 ng/ μL | 1 μL |
| Primer Reverse | 10 ng/ μL | 1 μL |
| Master Mix | | 10 μL |
| H ₂ O libre de RNAsas | | 16 μL |
| DNA | 100 ng/ μL | 2 μL |
| Volumen final de reacción | | 30 μL |

Las condiciones de reacción utilizadas para la PCR fueron previamente estandarizadas obteniéndose los resultados óptimos con las temperaturas y periodos presentados en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de la PCR

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

Repetir por 25 ciclos

4.7 Resolución de productos de PCR

Para analizar la integridad y tamaño de los productos de la PCR se realizó el mismo procedimiento que en el análisis integridad de DNA, utilizando en este caso un gel de agarosa 2.5%/TBE 1X.

4.8 Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit de purificación Illustra GFX. La metodología realizada fue la siguiente:

1. Se añadieron 150 µL de amortiguador de captura a la muestra y se homogeneizó.
2. Se transfirió la mezcla a la columna del estuche comercial dentro de un tubo colector y se centrifugó durante un minuto a 14000 r.p.m.
3. Se desechó el filtrado y se añadieron 500 µL de buffer de lavado a la columna. Se centrifugó durante un minuto a 14000 r.p.m.
4. Se desechó el filtrado y se colocó la columna en un tubo de reacción de 1.5 mL.
5. Se añadieron 15 µL de amortiguador de elución al centro de la columna y se dejó reposar durante 60 s a temperatura ambiente.
6. Se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 2 min y el filtrado se conservó a 4°C hasta su uso.

4.9 Reacción de secuenciación

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación se hizo uso del kit de secuenciación BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing. Los reactivos, concentraciones y volúmenes utilizados para llevar a cabo la reacción se resumen en la Tabla 7, mientras que la Tabla 8 resume las condiciones necesarias de temperatura.

Tabla 7. Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación

| Reactivo | Concentración | Volumen |
|----------------------------------|------------------|--------------|
| Primer Forward | 10 ng/ μ L | 1 μ L |
| Amortiguador | 5 x | 3.5 μ L |
| Big Dye | | 1 μ L |
| H ₂ O libre de RNAsas | | 12.5 μ L |
| Producto de PCR | ~100 ng/ μ L | 2 μ L |
| Volumen final de reacción | | 20 μ L |

Tabla 8. Condiciones de reacción de secuenciación

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

Repetir por 25 ciclos

4.10 Purificación de productos de reacción de secuenciación

La purificación de los productos de secuenciación se realizó utilizando columnas de purificación Centri-Sep.

🌱 Preparación de las columnas:

1. Se agregaron 750 μ L de agua estéril a cada columna para hidratarlas y se homogeneizaron asegurando la eliminación de burbujas.
2. Las columnas fueron conservadas a 4°C durante dos horas.
3. Se removió la tapa inferior y se introdujo la columna en un colector. Se centrifugó a 3000 r.p.m. durante un minuto.
4. Se desechó el líquido obtenido y se repitió el paso anterior quitando la tapa superior.

✿ **Purificación del amplicón:**

1. El producto de PCR fue aplicado en el centro de la columna teniendo la precaución de no tocar el gel formado.
2. Se centrifugó la columna sobre un tubo de reacción de 1.5 mL.
3. El filtrado fue concentrado a sequedad en un concentrador de vacío.

4.11 Secuenciación automatizada

El producto purificado se resuspendió en 15 µL de formamida ultrapura y se transfirió a una placa de 96 pozos. Se desnaturalizó a 94°C durante 5 minutos y se analizó en un secuenciador ABI PRISM 3130.

4.12 Análisis de la secuencia

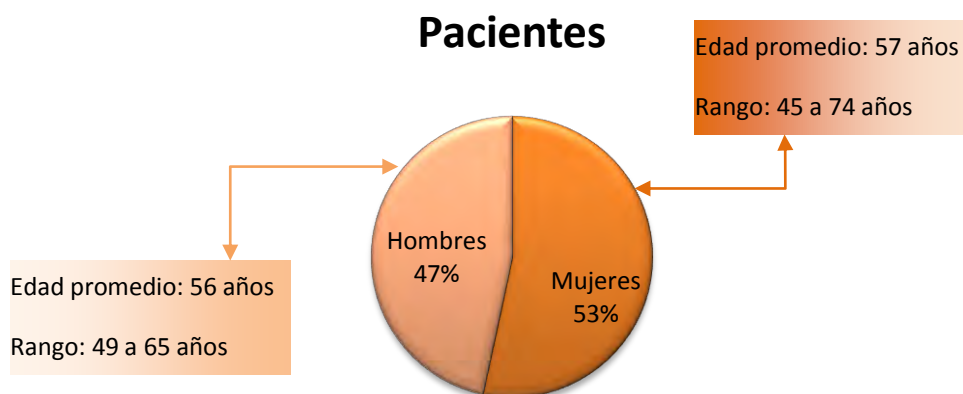
Este se realizó con el programa Sequencing Analysis v.5.3.

V. Resultados

5.1 Población estudiada

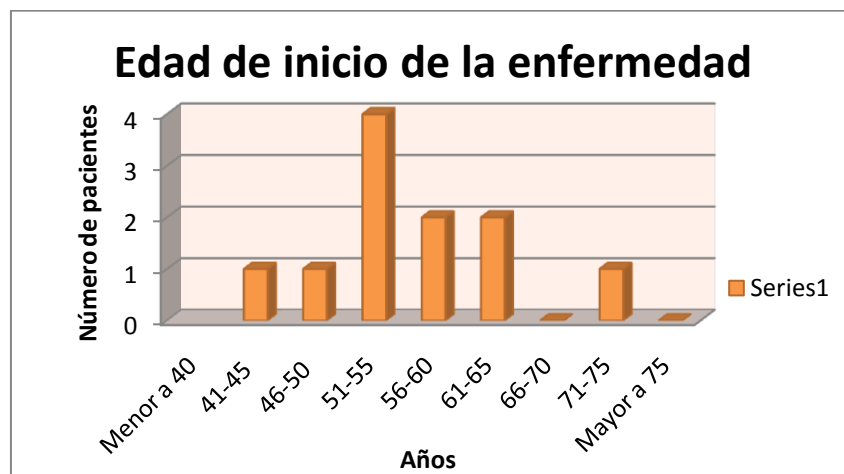
La población estudiada comprende 15 pacientes, de los cuales dos acudieron en el periodo octubre-diciembre del año 2008, seis en el año 2009 y 7 en el periodo enero-octubre del año 2010. La figura 21 muestra la distribución de las edades y el género de los pacientes.

Figura 21. Género y edad de los pacientes



En la figura 22 se puede apreciar la edad de inicio de la enfermedad, la cual es en la mayoría de los casos durante la quinta década de la vida.

Figura 22. Distribución de la edad de inicio de la enfermedad en los pacientes



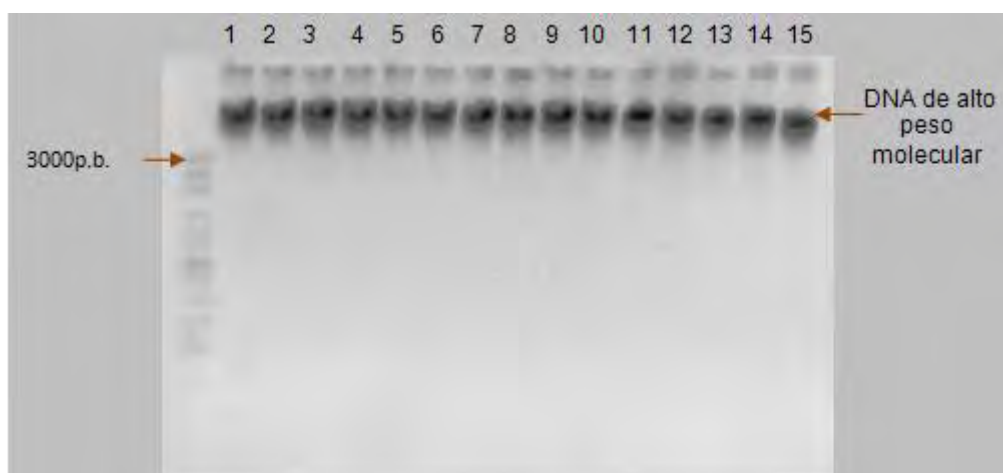
5.2 Cuantificación de DNA genómico

El DNA obtenido de las muestras de los pacientes analizados, muestra en promedio una concentración de 212 ng/ μ L, presentando un rango de pureza de 1.82 a 2 de acuerdo con la relación de A_{260}/A_{280} .

5.3 Análisis de integridad de DNA genómico

El DNA genómico obtenido fue íntegro y con un alto peso molecular, tal como lo ilustra la Figura 23, que muestra el resultado de una electroforesis horizontal del DNA en un gel de agarosa al 1% en TBE al 0.5x.

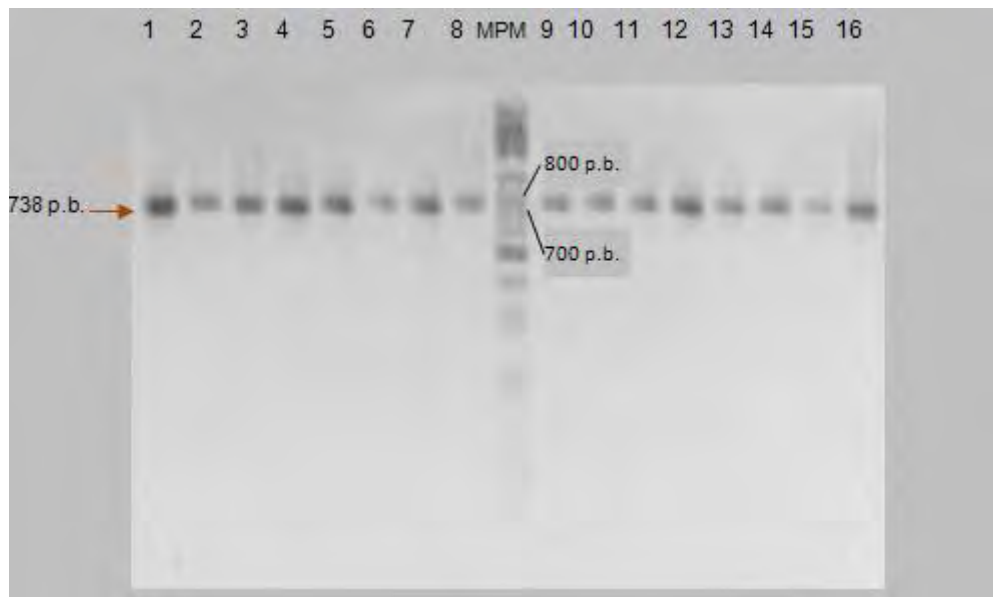
Figura 23. Integridad del DNA genómico



5.4 Análisis de productos de PCR

La amplificación del exón 2 del gen *PRNP* utilizando los oligonucleótidos señalados en el apéndice A, nos permite obtener un amplicón de 738 p.b., el cual contiene la región codificante para la proteína prión al flanquear por los extremos al exón mencionado.

Figura 24. Resolución de los productos de PCR mediante electroforesis

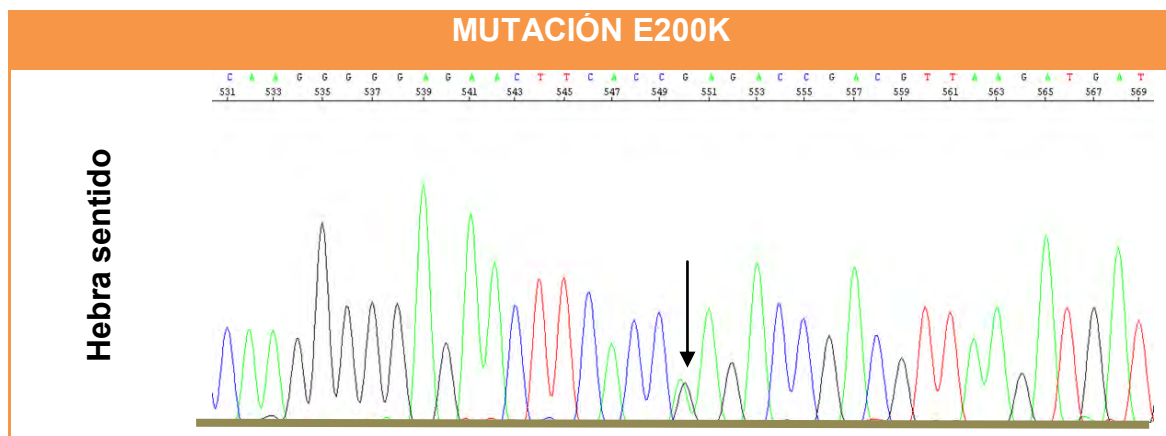


Tal como lo muestra la Figura 24, el amplicón obtenido muestra el peso molecular esperado y no presenta amplificaciones inespecíficas.

5.4 Polimorfismos y mutaciones encontradas

El amplicón obtenido fue posteriormente purificado y secuenciado, encontrándose dos mutaciones en posiciones distintas; la E200K y la T188R, las cuales se ilustran en los electroferogramas de las tablas 10 y 11.

Tabla 9. Electroferogramas mostrando la mutación E200K



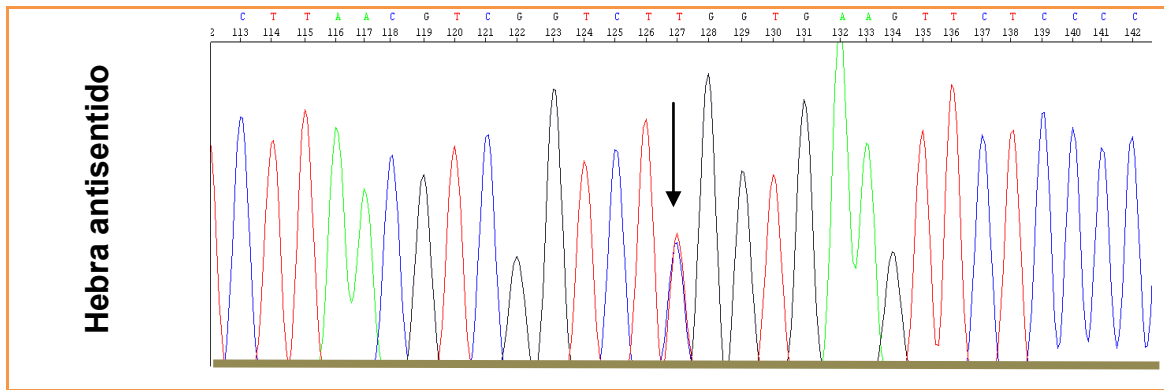
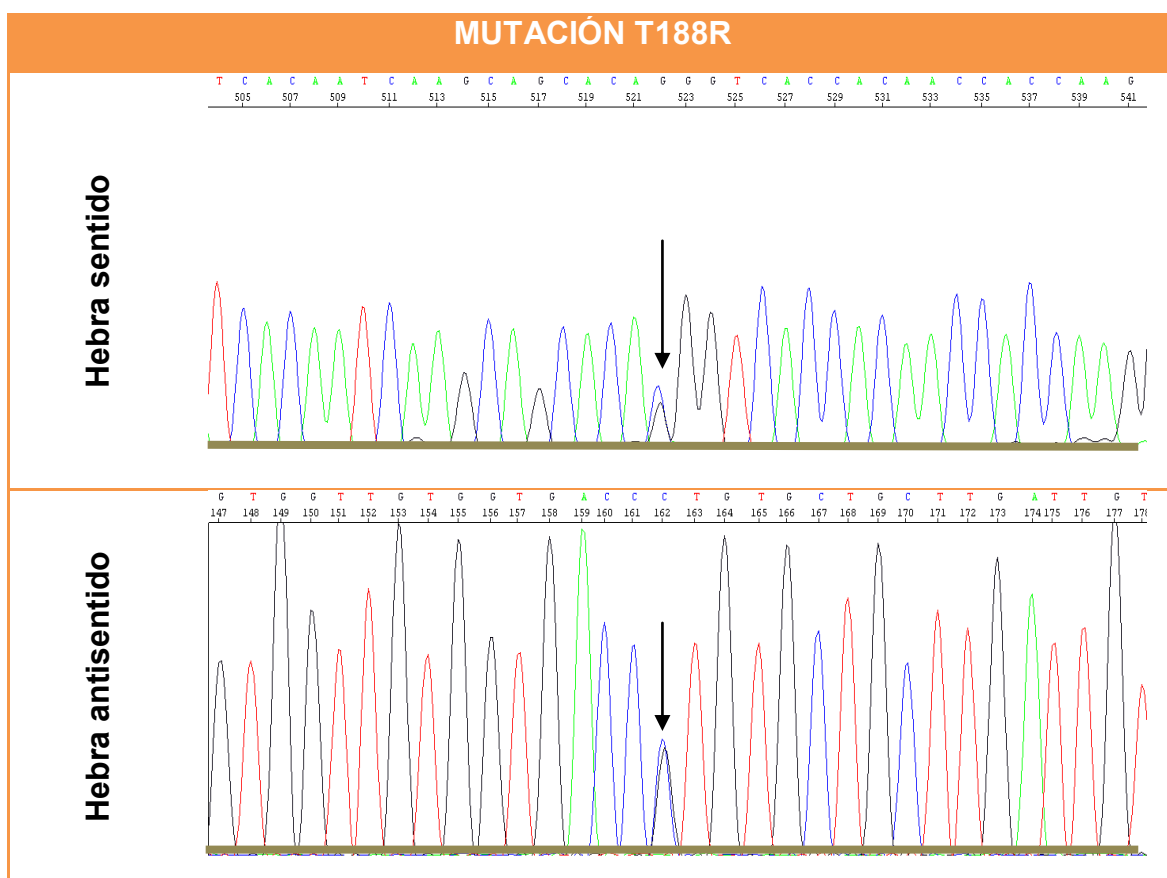


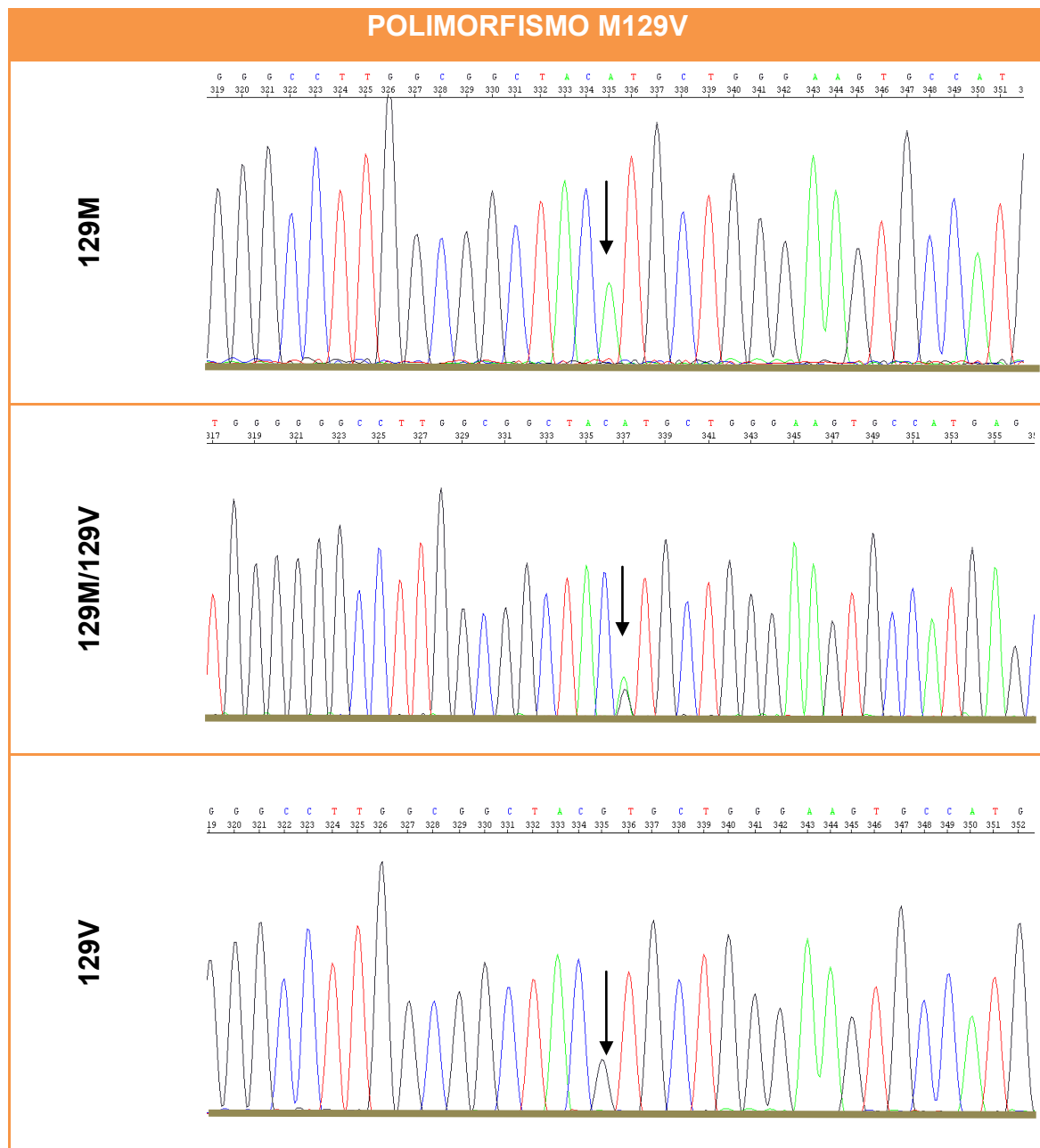
Tabla 10. Electroferogramas mostrando la mutación T188R



Tal como lo muestran las tablas 10 y 11, las mutaciones fueron corroboradas al analizarse tanto la hebra sentido como la antisentido.

Al analizarse los polimorfismos asociados a riesgo únicamente se encontraron variaciones en el codón 129, encontrándose individuos homocigotos para el aminoácido metionina, para el aminoácido valina o individuos heterocigotos.

Tabla 11. Electroferogramas mostrando el polimorfismo M129V



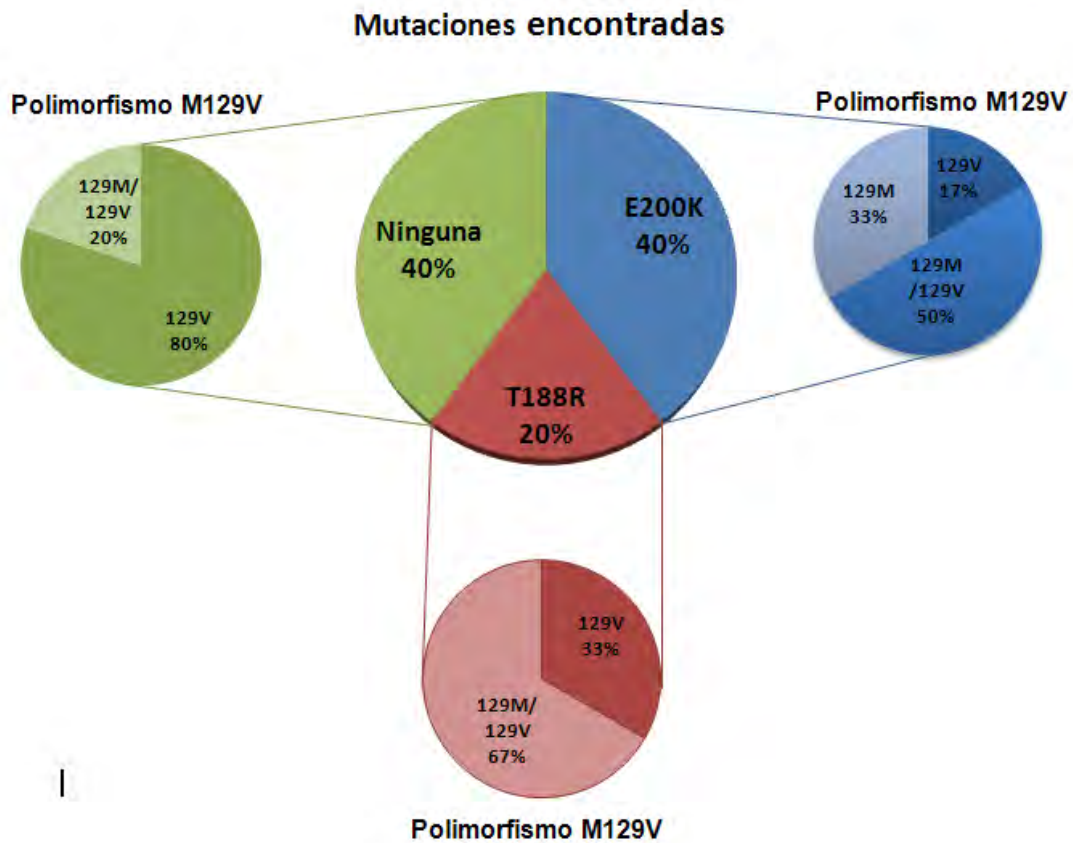
La tabla 13 resume el polimorfismo en el codón 129 y las mutaciones encontradas en cada uno de los pacientes.

Tabla 12. Variaciones encontradas en el gen *PRNP*

| Paciente | Polimorfismo M129V | Mutación encontrada | | |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|------------|
| | | Cambio de aminoácido | Cambio de nucleótido | Referencia |
| 1 | 129V | 200E/E200K | c.598G>A | rs28933385 |
| 2 | 129M/129V | 200E/E200K | c.598G>A | rs28933385 |
| 3 | 129V | Ninguna | | |
| 4 | 129V | Ninguna | | |
| 5 | 129V | Ninguna | | |
| 6 | 129V | 188T / T188R | c.563C>G | VAR_008747 |
| 7 | 129V | Ninguna | | |
| 8 | 129M/129V | Ninguna | | |
| 9 | 129M | 200E/E200K | c.598G>A | rs28933385 |
| 10 | 129M/129V | Ninguna | | |
| 11 | 129M/129V | 188T / T188R | c.563C>G | VAR_008747 |
| 12 | 129M/129V | 200E/E200K | c.598G>A | rs28933385 |
| 13 | 129M | 200E/E200K | c.598G>A | rs28933385 |
| 14 | 129M/129V | 200E/E200K | c.598G>A | rs28933385 |
| 15 | 129M/129V | 188T / T188R | c.563C>G | VAR_008747 |

De manera gráfica se muestra la distribución general de los polimorfismos y mutaciones encontradas en los 15 pacientes analizados en la Figura 25.

Figura 25. Mutaciones encontradas y polimorfismos asociados.



5.5 Frecuencias del polimorfismo M129V

La tabla muestra la comparación entre las frecuencias del alelo codificante de metionina o valina en pacientes y controles.

Tabla 13 Frecuencias alélicas y genotípicas en el codón 129.

| | N | Genotipos | | | Frecuencia alelo Met | Frecuencia alelo Val |
|--------------|-----|-----------|-------|-------|----------------------|----------------------|
| | | M/M % | M/V% | V/V% | | |
| E200K | 6 | 33.33 | 50 | 16.67 | 0.583 | 0.416 |
| T188R | 3 | 0 | 66.67 | 33.33 | 0.333 | 0.667 |
| Sin mutación | 6 | 0 | 33.33 | 66.67 | 0.167 | 0.833 |
| Total | 15 | 13.33 | 46.67 | 40 | 0.367 | 0.633 |
| Control | 100 | 37 | 51 | 12 | 0.625 | 0.375 |

VI. Análisis de resultados

De los quince pacientes estudiados, tres presentaron la mutación T188R, seis la E200K y seis más no presentaron mutación en la región analizada. De los polimorfismos reportados únicamente se encontró variación en el codón 129. Es importante destacar que la región analizada abarca todas las mutaciones reportadas en la literatura para el gen *PRNP* como causa de enfermedad priónica o factor de riesgo hasta el momento, a excepción del polimorfismo reportado por Vollmert en región no codificante.[21]

Como se ilustra en la figura 25, la mutación E200K se presenta en un 40% de los casos en estudio. Esta mutación ha sido previamente reportada y condiciona para la fCJD, es la mutación con más alta prevalencia en pacientes con esta enfermedad, contribuyendo hasta en un 70% de los casos a nivel mundial. Lee sugiere un haplotipo asociado a esta mutación, el cual tiene un origen común en poblaciones libanesas, italianas, españolas y chilenas, y dado el mestizaje de nuestra población, no sería raro el encontrar en estos pacientes dicho haplotipo, lo cual requiere ser demostrado [63].

Se han planteado diversas consecuencias de esta mutación en la estructura y propiedades de la proteína con base en modelos teóricos y RMN. La figura 26 muestra la ubicación espacial del aminoácido glutamina en la posición 200, el cual es sustituido por una lisina en esta mutación.



Figura 26. Ubicación espacial de E200 en la proteína prión.

La imagen muestra la ubicación espacial del aminoácido glutamina en la posición 200 en la proteína prión en un modelo tridimensional. Obtenida de Protein Data Bank [140]

Entre las consecuencias de la mutación E200K, algunos autores plantean que los puentes salinos sufren alteraciones, pero éstas no producen una diferencia notable con respecto a la proteína normal. Otros autores plantean que la mutación puede alterar la estabilidad de la α -hélice C [64], pero que igualmente, esta modificación no afecta la estabilidad termodinámica de la proteína, sin embargo, cambia el potencial electrostático de la superficie de la proteína, lo cual podría repercutir en la interacción de la PrP^C con otras proteínas o con la membrana celular misma. [141,142]

Las consecuencias de esta mutación difieren entre las diferentes publicaciones. Otros autores sugieren que la glicosilación de la proteína se ve afectada, pero hay controversia al respecto, al igual que con la propuesta de la generación de una inestabilidad de la α -hélice A.[65]

Por otra parte, la mutación T188R ha sido reportada únicamente en dos pacientes, uno proveniente de Alemania y otro proveniente de una familia mexicano-estadounidense. El primero de estos reportes plantea incertidumbre sobre las repercusiones de la mutación y su relación con el fenotipo presente, la segunda publicación establece la relación entre esta variante y la enfermedad de Creutzfeldt Jakob con base en los hallazgos histopatológicos. Es importante destacar que se analizó la prevalencia de esta mutación en más de 700 controles provenientes de Alemania para determinar si ésta era un polimorfismo, y los resultados fueron negativos, comprobando que se trataba de una mutación al no encontrarse en ninguno de los controles analizados. [143,144]



Figura 27. Ubicación espacial de T188 en la proteína prión.

La imagen muestra la ubicación espacial del aminoácido treonina en la posición 188 en la proteína prión en un modelo tridimensional. Obtenida de Protein Data Base [140].

De manera interesante, ambos casos reportados están acoplados al polimorfismo de riesgo en el codón 129 de manera homocigota o heterocigota para valina; los pacientes de esta muestra, portadores de esta mutación también están acoplados al alelo 129V de manera homocigota y heterocigota, sin encontrar asociación con el alelo 129M de manera homocigota, por lo cual podría plantearse una segregación de la mutación acoplada al alelo 129V.

Las repercusiones de esta mutación sobre la estabilidad de la proteína no muestran cambios evidentes en su procesamiento, sin embargo, estudios realizados in vitro de la proteína mutada demuestran que ésta es resistente a la degradación por proteinasa K y es insoluble en detergentes, lo cual indica un alto grado de agregación que puede ser responsable del fenotipo observado en estos pacientes. [72]

Al analizar la repercusión de éstas mutaciones utilizando el programa PolyPhen-2, se predice un efecto probablemente dañino para ambas mutaciones, obteniéndose

un valor de 0.979 para la mutación T188R y 0.903 para la E200K. Además, ambos residuos se encuentran altamente conservados [145].

Como se mencionó previamente, seis de los pacientes analizados no mostraron mutaciones en el exón dos del gen *PRNP*, lo cual no descarta que estos pacientes no padezcan una enfermedad priónica, ya que como se señala a lo largo del trabajo, las enfermedades priónicas pueden tener diferente etiología, y por tanto, se le debe dar seguimiento al diagnóstico, ya que se puede tratar de formas adquiridas representando un riesgo sanitario. El diagnóstico confirmatorio de estos pacientes debe realizarse a través de la autopsia.

En cuanto a polimorfismos, sólo se encontraron variaciones en el polimorfismo del codón 129, en el cual se ha demostrado una alta variabilidad a nivel mundial mientras que los otros polimorfismos reportados en este gen, son raros y sólo se presentan en algunas poblaciones específicas como se mencionó en la introducción.

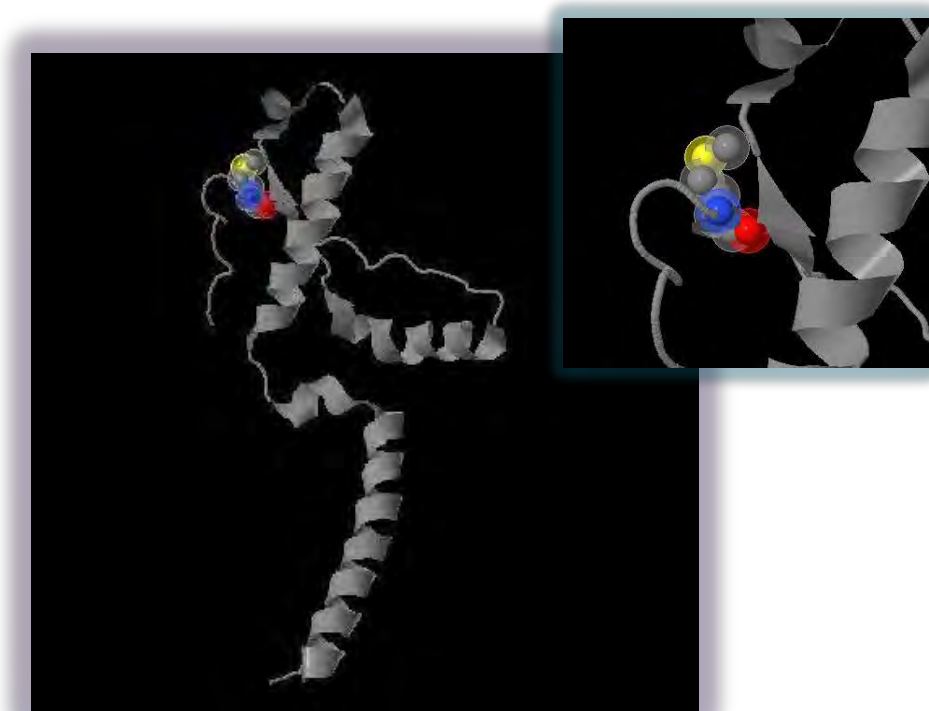


Figura 28. Ubicación espacial de M129 en la proteína prión. La imagen muestra la ubicación espacial del aminoácido metionina en la posición 129 en la proteína prión en un modelo tridimensional. Obtenida de Protein Data Base [140].

Las frecuencias obtenidas en los pacientes analizados para este polimorfismo se muestran en la tabla 13, en la cual se puede apreciar la alta frecuencia del alelo

129V. Estos resultados concuerdan con lo señalado en la literatura, de que este polimorfismo tiene una alta incidencia en población de ascendencia nativa americana en comparación con la población europea.[23]

La presencia de este polimorfismo, M129V, tiene una gran repercusión en el fenotipo de los pacientes con enfermedades priónicas, en general, su efecto se ve reflejado en la edad de inicio de la enfermedad. Pacientes homocigotos, ya sea para metionina o valina tienen una edad de inicio más temprana que aquellos que son heterocigotos.[23] Sin embargo, en nuestros resultados no se observa una relación directa entre la edad de inicio y el genotipo de los pacientes, lo cual podría deberse al tamaño tan pequeño de muestra, y a que un gran número de ellos son heterocigotos.

Se encuentra una gran similitud en cuanto a la edad de inicio de la enfermedad de la muestra estudiada con lo reportado en la literatura como se mostró en las figuras 17 y 22.

Como se mencionó anteriormente, la mutación T188R se encuentra acoplada al polimorfismo 129V de manera homocigota o heterocigota. Por su parte, la mutación E200K está presente en individuos tanto heterocigotos como homocigotos para ambos alelos. Es de esperarse que aquellos individuos homocigotos en el codón 129 presenten un fenotipo más severo que aquellos heterocigotos de acuerdo a la literatura. [23]

Son escasos los reportes que existen en México sobre pacientes con enfermedades priónicas, sólo existen dos casos reportados de pacientes con enfermedad de Creutzfeldt Jakob, uno proveniente del estado de Coahuila [146] y otro del estado de Jalisco [147], además del estudio de la familia con enfermedad de GSS reportada por el mismo grupo de trabajo [148]. El hecho de encontrar nueve pacientes con una mutación en el gen *PRNP* en un periodo de dos años nos habla de la posibilidad de que no se esté realizando un diagnóstico correcto de estas enfermedades en nuestro país, lo cual indica un riesgo no sólo para los individuos afectados y sus familiares en riesgo cuando se trata de formas familiares o cuando son adquiridas, constituyen un riesgo para la población en general, ya que cuando estos pacientes son sometidos a tratamientos quirúrgicos o son donadores de transfusiones sanguíneas éstos representan un riesgo para los receptores.

Este grupo de enfermedades tienen una baja frecuencia en el mundo, en México no existe un estudio epidemiológico que determine su frecuencia, ya que muchas veces los pacientes son diagnosticados erróneamente. El estudio realizado por Bruton en Inglaterra y con base en autopsias, mostró que el 40% de los casos de enfermedades priónicas no fueron diagnosticados en vida.[149]

Los resultados obtenidos en el presente estudio van más allá de la identificación de polimorfismos y mutaciones en el gen *PRNP*, ya que muestran un panorama no conocido sobre la incidencia de éstas enfermedades en nuestro país, y dado el agente etiológico de las enfermedades priónicas y sus características físicas y biológicas, debe promover la toma de acciones por parte del sector salud correspondiente para el manejo correcto de los desechos y mejorar el diagnóstico de éstos padecimientos, favoreciendo así al paciente y a la población en general.

El conocer el diagnóstico definitivo de estas enfermedades mediante el análisis del gen *PRNP* en los pacientes proporcionará un diagnóstico certero del padecimiento y un mejor manejo del paciente, lo que permitirá un asesoramiento genético de los riesgos dependiendo si se trata de una forma familiar o de una adquirida.

VII. Conclusiones.

Se identificó la mutación T188R en tres pacientes y la mutación E200K en seis pacientes de la población estudiada, ambas mutaciones han sido previamente reportadas y condicionan a la enfermedad de Creutzfeldt Jakob.

No se muestra una asociación específica entre el polimorfismo M129V y la mutación E200K; por otra parte, la mutación T188R está asociada a la presencia del alelo 129V.

El presente estudio es el primero en abordar las enfermedades priónicas en general en pacientes mexicanos desde el punto de vista genético, y muestra que la incidencia de las enfermedades priónicas está subestimada en México.

VIII. Bibliografía.

1. Schneider K, Fangerau H, Michaelsen B, Raab W. The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain. Res. Bull.* (2008); 77:343-55.
2. Van Everbroeck B, Pals P, Martin J, Cras P. Transmissible spongiform encephalopathies: the story of a pathogenic protein. *Peptides.* (2002); 23: 1351-9.
3. Creutzfeldt G. Über eine eigenartigen hertförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Neurol. Psychiatr.* (1920); 57:1–19.
4. J. Gerstmann, Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Wiener Medizinische Wochenschrift* (1928); 78:906-8.
5. Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative diseases of the central nervous system in New Guinea: the endemic occurrence of “kuru” in the native population. *New Engl. J. Med.* (1957); 257: 212–4.
6. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* (1966); 209:794–6.
7. AlperT, Cramp W, Haig D, Clarke M. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* (1967); 214: 764–6.
8. Griffith J. Self-replication and scrapie. *Nature* (1967); 215: 1043–4.
9. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* (1982); 216:136–44.
10. Caughey B, Kocisko D, Raymond G, Lansbury P. Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem. Biol.* (1995); 2:807–17.
11. Prusiner SB. Prions: novel infectious pathogens. *Adv. Virus Res.* (1984); 29:1–56.

12. Chesebro B, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* (1985); 315: 331–3.
13. Prusiner SB. Molecular structure, biology, and genetics of prions. *Adv. Virus Res.* (1988); 35: 83–136.
14. Entrez Gene, NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
15. Ensembl Project. <http://www.ensembl.org/>
16. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *Am. J. Hum. Genet.* (1991); 49: 320-9.
17. Mehrpour M, Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett.* (2010); 290:1-23.
18. Mahal SP, Asante EA, Antoniou M, Collinge J. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene.* (2001); 268: 105-14.
19. SABiosciences, a QIAGEN company. <http://www.sabiosciences.com>
20. Haigh C, Brown D. Regulation of prion protein expression: A potential site for therapeutic intervention in the transmissible spongiform encephalopathies. *Int J Biomed Sci.* (2006); 2: 315-323
21. Vollmert C, et. al. Significant association of a M129V independent polymorphism in the 5' UTR of the *PRNP* gene with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a large German case-control Study *J. Med. Genet.* (2006); 43: 1-9.
22. Collins S, et al. No evidence for prion protein gene *locus* multiplication in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* (2010); 472:16-8.
23. Mead S. Prion disease genetics. *Eur. J. Hum. Genet.* (2006); 14:273-81.
24. Wopfner F, et al. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* (1999); 289: 1163–78.

25. Harrison PM, Khachane A, Kumar M. Genomic assessment of the evolution of the prion protein gene family in vertebrates. *Genomics* (2010); 95: 268-277.
26. Schatzl HM, et al. Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* (1995); 245: 362–74.
27. Van der Kamp M, Daggett V. The consequences of pathogenic mutations to the human prion protein. *Protein Eng. Des. Sel.* (2009); 22: 461-8.
28. Nicolas O, Gavín R, del Río J. New insights into cellular prion protein (PrP^C) functions: The “ying and yang” of a relevant protein. *Brain Res. Rev.* (2009); 61:170-184.
29. Calzolari L, Zahn R. Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. *J. Biol. Chem.* (2003); 278: 35592–96.
30. Uniprot. <http://www.uniprot.org/>
31. Prusiner SB, Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998); 95: 13363–83.
32. Zeng F, et al. Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J. Neurochem.* (2003); 84: 480–90.
33. Riek R, et. al. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23–231). *FEBS Lett.* (1997); 413: 282–8.
34. Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos, Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein, *EMBO J.* (2001); 20: 5383–91.
35. Fornai F, et. al. A hypothesis on prion disorders: Are infectious, inherited, and sporadic causes so distinct? *Brain Res. Bull.* (2006); 69: 95-100.
36. Ma J, Lindquist S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP-like conformation in the cytosol, *Science* (2002); 298: 1785–8.
37. Paitel E, Fahraeus R, Checler F. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53- dependent caspase 3-like activation. *J. Biol. Chem.* (2003); 278: 10061– 6.

38. Soldevila M, et al. Prion susceptibility and protective alleles exhibit marked geographic differences. *Hum. Mutat.* (2003); 22: 104– 15.
39. Lucotte G, Mercier G. 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.* (2005); 5: 141– 4.
40. Mead S, et al. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science.* (2003);300: 640-3.
41. Hardy J, Scholz S, Evans W, Goldfarb L, Singleton. A Prion genotypes in Central America suggest selection for the V129 allele. *Am. J. Med. Genet.* (2006);141:33-5.
42. Zeidler M, Stewart G, Cousens SN, Estebeiro K, Will RG. Codon 129 genotype and new variant CJD. *Lancet* (1997); 350: 668-76.
43. Seno H, Tashiro H, Ishino H, Inagaki T, Nagasaki M, Morikawa S. New haplotype of familial Creutzfeldt – Jakob disease with a codon 200 mutation and a codon 219 polymorphism of the prion protein gene in a Japanese family. *Acta Neuropathol.* (2000); 99: 125– 30.
44. Mead S, et al. A novel protective prion protein variant that colocalizes with kuru exposure. *N. Engl. J. Med.* (2009); 361: 2056-65
45. Palmer MS, et al. Deletions in the prion protein gene are not associated with CJD. *Hum. Mol. Gen.* (1993); 2: 541– 4.
46. The Official Mad Cow Disease. Home Page. <http://www.mad-cow.org/>
47. Jackson GS, et al. HLA-DQ7 antigen and resistance to variant CJD. *Nature* (2001); 414: 269– 70.
48. Pepys MB, et al. MHC typing in variant Creutzfeldt – Jakob disease. *Lancet* (2003); 361: 487– 9.

49. Mead S, Beck J, Dickinson A, Fisher E, Collinge J. Examination of the human prion protein-like gene Doppel for genetic susceptibility to sporadic and variant Creutzfeldt – Jakob disease. *Neurosci. Lett.* (2000); 290: 117–20.
50. Chapman J, et. al. APOE in non- Alzheimer amyloidoses: transmissible spongiform encephalopathies. *Neurology* (1998); 51: 548– 53.
51. Van Everbroeck B, et. al. Influence of the prion protein and the apolipoprotein E genotype on the Creutzfeldt – Jakob Disease phenotype. *Neurosci. Lett.* (2001); 313: 69– 72.
52. Alonso D, Daggett V. Mapping the early steps in the pH-induced conformational conversion of the prion protein. *Adv. Protein. Chem.* (2001); 57: 107–37.
53. Supattapone S, et. al. A protease-resistant 61-residue prion peptide causes neurodegeneration in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, (2001); 21: 2608–16.
54. Hegde R, et. al. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* (1998); 279: 827–34.
55. Watzlawik J, et. al. Prion protein helix1 promotes aggregation but is not converted into beta-sheet. *J. Biol. Chem.* (2006); 281: 30242–30250.
56. Heske,J., Heller,U., Winklhofer,K.F. and Tatzelt,J. The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* (2004); 279: 5435–43.
57. Kundu B, et. al. Nucleation-dependent conformational conversion of the Y145Stop variant of human prion protein: structural clues for prion propagation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* (2003); 100: 12069–74.
58. Goldfarb L, et. al. Transmissible familial Creutzfeldt – Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the *PRNP* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991); 88: 10926 –30.
59. Cochran E, et. al. Familial Creutzfeldt – Jakob disease with a five-repeat octapeptide insert mutation. *Neurology* (1996); 47: 727– 733.

60. Rodriguez M, et. al. A novel mutation (G114V) in the prion protein gene in a family with inherited prion disease. *Neurology* (2005); 64: 1455– 1457.
61. Croes E, et. al. Octapeptide repeat insertions in the prion protein gene and early onset dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2004); 75: 1166–70.
62. Lee H, et. al. Ancestral origins and worldwide distribution of the *PRNP* 200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Hum. Genet.* (1999); 64: 1063-70.
63. Simon ES, et. al. Creutzfeldt – Jakob disease profile in patients homozygous for the *PRNP* E200K mutation. *Ann. Neurol.* (2000); 47: 257– 60.
64. Gallo M, et. al. Identification of a conserved N-capping box important for the structural autonomy of the prion alpha 3-helix: the disease associated D202N mutation destabilizes the helical conformation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* (2005); 18: 95–112.
65. Levy Y, Becker O. Conformational polymorphism of wild-type and mutant prion proteins: Energy landscape analysis. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* (2002); 47: 458–68.
66. Schiff E, et. al. Coexpression of wild-type and mutant prion proteins alters their cellular localization and partitioning into detergent-resistant membranes. *Traffic* (2008); 9: 1101–15.
67. Mitrova E, Huncaga S, Hocman G, Nyitralova O, Tatara M. “Clusters” of CJD in Slovakia: the first laboratory evidence of scrapie. *Eur. J. Epidemiol.* (1991); 7: 520–3
68. Hsiao K, et. al. Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* (1991); 324: 1091–7
69. Galvez S, Masters C, Gajdusek DC. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Chile. *Arch. Neurol.* (1980); 37: 11–4
70. Kiachopoulos,S., Bracher,A., Winklhofer,K.F. and Tatzelt,J. Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with

- folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor. J. Biol. Chem. (2005); 280: 9320–9.
71. Lorenz H, Windl O, Kretzschmar H. Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. J. Biol. Chem. (2002); 277: 8508–16.
 72. Gu Y, Singh A, Bose S, Singh N. Pathogenic mutations in the glycosylphosphatidylinositol signal peptide of PrP modulate its topology in neuroblastoma cells. Mol. Cell. Neurosci. (2008); 37: 647–656.
 73. Peoc'h K, et al. First report of polymorphisms in the prion-like protein gene (*PRND*): implications for human prion diseases. Neurosci. Lett. (2000); 286: 144-8.
 74. Makrinou E, Collinge J, Antoniou M. Genomic characterization of the human prion protein (PrP) gene *locus*, Mamm. Genome (2002); 13: 696–703.
 75. Premzl M, Gamulin V. Comparative genomic analysis of prion genes. BMC Genomics (2007); 8: 1-8.
 76. Watts JC, et. al. The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections, EMBO J. (2007); 26: 4038–50.
 77. Su AI, et. al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2004); 101: 6062–7.
 78. GeneAtlas <http://www.geneatlas.org/gene>
 79. Bailly Y, et al. Prion protein (PrP_C) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain. J. Comp. Neurol. (2004); 473: 244–69.
 80. Ford M, et. al. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. Neuroscience (2002); 113: 177–92.
 81. Brown D. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. Trends Neurosci. (2001); 24: 85-90.

82. Edenhofer, F, et al. Prion protein PrP^c interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.* (1996); 70: 4724–8.
83. Kurschner C, Morgan J, The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (1995); 30: 165–8.
84. Santuccione A, et al. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* (2005); 169: 341–354.
85. Graner E, et. al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* (2000); 76: 85–92.
86. Zhang C. et. al. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006); 103: 2184–9.
87. Kikuchi Y, et. al. G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* (2002); 25: 728–33.
88. Gougoumas D. et. al. Transcriptional activation of prion protein gene in growth-arrested and differentiated mouse erythroleukemia and human neoplastic cells. *Exp. Cell Res.* (2001); 264: 408–17.
89. Hu W, et. al. Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. *J. Neurol. Sci.* (2008); 264:1-8.
90. Haigh C, et. al. Copper binding is the governing determinant of prion protein turnover. *Mol. Cell. Neurosci.* (2005); 30: 186–96.
91. Lauren J, et. al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* (2009); 457: 1128–32.
92. Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J. Neurochem.* (2003); 86: 538–44.
93. Mironov A, et. al. Cytosolic prion protein in neurons. *J. Neurosci.* (2003); 23: 7183–93.

94. Brown D, et. al. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* (1997); 146: 104–12.
95. Brown D, et. al. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* (1999); 344: 1–5.
96. Hutter G, et. al. No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol. Chem.* (2003); 384: 1279–85.
97. Para C, Wurm S, Pfarr W, Sonnleitner A, Wechselberger C. Prion protein resides in membrane microclusters of the immunological synapse during lymphocyte activation. *Eur. J. Cell Biol.* (2007); 86: 253–64.
98. Preusser M, et. al. Alzheimer-type neuropathology in a 28 year old patient with iatrogenic Creutzfeldt–Jakob disease after dural grafting. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2006); 77: 413–6.
99. Bueler H, et. al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* (1992); 356: 577–82.
100. Manson J, et. al. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* (1994); 8: 121–7.
101. Watts J, et. al. The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J.* (2007); 26: 4038–50.
102. Collinge J. Variant Creutzfeldt – Jakob disease. *Lancet* (1999); 354: 317– 23.
103. Aguzzi A, Heppner F. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ.* (2000); 7:889-902
104. Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser P. Prions: health scare and biological challenge. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2001); 2: 118-26.
105. Online Mendelian Inheritance in Man, NCBI (OMIM). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

106. Moore RC, Xiang F, Monaghan J, Han D, Zhang Z, Edström L, Anvret M, Prusiner SB. Huntington disease phenocopy is a familial prion disease. *Am. J. Hum. Genet.* (2001); 69:1385-8.
107. Mandujano A, et al. Fisiopatología de las enfermedades por priones. *Gac. Med. Méx.* (2006); 142: 399-406.
108. Wieser H, Schindler K, Zumsteg D. EEG in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Neurophysiol.* (2006); 117: 935-51.
109. Mastrianni James A. Genetic Prion Diseases. GeneReviews 1993, NCBI.
110. Gmitterová K, et al. 14-3-3 levels in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease differ across molecular subtypes. *Neurobiol. Aging* (2009); 30: 1842-50.
111. Alison J, et. al. 14-3-3 in the cerebrospinal fluid of patients with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease measured using capture assay able to detect low levels of 14-3-3 protein. *Neurosci. Lett.* (2002); 324: 57-60.
112. Villegas C. Prion diseases: from molecular biology to clinical practice. *Acta Neurol. Colomb.* (2010); 26: 87-111.
113. Hans A, et. al. Diagnostic Criteria for Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease *Arch Neurol.* (1996); 53: 913-20.
114. World Health Organization. <http://www.who.int/en/>
115. Iwasaki Y, et. al. Clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease: Accuracy based on analysis of autopsy-confirmed cases. *J. Neurol. Sci.* (2009); 277 (1-2): 119-123.
116. Ironside JW. Prion diseases in man. *J Pathol.* (1998); 186: 227-34.
117. Brandel JP, et. al. Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain. *Ann. Neurol.* (2009); 65: 249-56.
118. Ghosh S. Mechanism of intestinal entry of infectious prion protein in the pathogenesis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* (2004); 56: 915-20.
119. Cooper S, Murray K, Heath C, Will R, Knight R. Isolated visual symptoms at onset in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: the clinical phenotype of the 'Heidenhain variant'. *Brit. J. Ophthal.* (2005); 89: 1341-2

120. Keyrouz S, Labib B, Sethi R. MRI and EEG findings in Heidenhain variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* (2006); 67: 333
121. Dickinson AG, Mackay JMW. Genetical control of the incubation period in mice of the neurological disease, scrapie. *Heredity* (1964); 19: 279–88.
122. Mastrianni JA, Roos RP. The prion diseases. *Semin Neurol.* (2000); 20:337-52.
123. Peiffer J. Gerstmann-Sträussler's disease, atypical multiple sclerosis and carcinomas in a family of sheepbreeders. *Acta Neuropathol.* (1982); 56:87-92.
124. Hudson A, Farrell M, Kalnins R, Kaufmann J. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with coincidental familial onset. *Ann. Neurol.* (1983); 14: 670-8,
125. Barbanti P, Fabbrini G, Salvatore M et al. Polymorphism at codón 129 or codon 219 of *PRNP* and clinical heterogeneity in a previously unreported family with Gerstmann– Straussler – Scheinker disease (PrP-P102L mutation). *Neurology* (1996); 47: 734– 41.
126. Shi X, et. al. Clinical, histopathological and genetic studies in a family with fatal familial insomnia. *Infect. Genet. Evol.* (2010); 10: 292-297.
127. Goldfarb L, et. al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* (1992); 258: 806-8.
128. Zarranz J, et. al. Phenotypic variability in familial prion diseases due to the D178N mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2005);76:1491-6.
129. Dauvilliers Y, et. al. Dissociation in circadian rhythms in a pseudohypersomnia form of fatal familial insomnia. *Neurology* (2004); 63: 2416-8.
130. Lugaresi E, et. al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.* (1986); 315:997-1003.
131. Harder A, et. al. Novel twelve-generation kindred of fatal familial insomnia form Germany representing the entire spectrum of disease expression. *Am. J. Med. Genet.* (1999); 87: 311-6.
132. Saitoh Y, et. al. Discordant clinicopathologic phenotypes in a Japanese kindred of fatal familial insomnia. *Neurology* (2010); 74: 86-9.
133. Dimitri D, et. al. Fatal familial insomnia presenting as psychosis in an 18-year-old man. *Neurology* (2006); 67: 363-4.
134. Parchi P, et. al. A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology* (1999); 52: 1757-63.

135. Wadsworth J, et. al. Kuru prions and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prions have equivalent transmission properties in transgenic and wild-type mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (2008); 105: 3885-90.
136. Cervenakova L, Goldfarb L, Garruto R, Lee H, Gajdusek D, Brown P. Phenotype-genotype studies in kuru: implications for new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1998); 95: 13239-41.
137. Soldevila M, Calafell F, Helgason A, Stefansson K, Bertranpetit J. Assessing the signatures of selection in *PRNP* from polymorphism data: results support Kreitman and Di Rienzo's opinion. *Trends Genet.* (2005); 21: 389-91.
138. Enfermedades Producidas por Priones. <http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/bse/priones/priones>
139. Zúñiga S, Urista M, Ruiz J. Enfermedad de Creutzfeldt Jacob. Del Kuru a las Vacas Locas. *Rev. Mex. Neu.* (2002); 3: 13-19.
140. RCSB Protein Data Bank <http://www.pdb.org>
141. Swietnicki,W., Petersen,R.B., Gambetti,P. and Surewicz,W.K. Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein. *J. Biol. Chem.* (1998); 273: 31048–52.
142. Zhang Y, Swietnicki W, Zagorski M, Surewicz W, Sonnichsen F. Solution structure of the E200K variant of human prion protein. Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases. *J. Biol. Chem.* (2000); 275: 33650–4.
143. Roeber S, et. al. Evidence for a pathogenic role of different mutations at codon 188 of *PRNP*. *PLoS One.* (2008); 3: 1-8.
144. Tartaglia MC, et. al. Pathologic Evidence That the T188R Mutation in *PRNP* Is Associated With Prion Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2010); 69:1220-7.
145. PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs <http://genetics.bwh.harvard.edu>
146. Calderón A, Sagastegui J, Canales C. Un caso de Creutzfeldt-Jakob en el noreste de México y revisión de conceptos actuales sobre enfermedad por priones. *Gac. Méd. Méx.* (2001); 137: 589-594.
147. Reyes M. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Medica sur* (2002); 9: 79-87.

148. Yescas P, López M, Franco J, Alonso M. Genética de las enfermedades crónicas. Arch. Neurocién. Mex. (2008); 13: 242-51.
149. Bruton CJ, Bruton RK, Gentleman SM, Roberts GW. Diagnosis and incidence of prion (Creutzfeldt – Jakob) disease: a retrospective archival survey with implications for future research. Neurodegeneration (1995); 4: 357–68.

IX. Apéndice.

a. Reactivos

- Agarosa ultrapura (Invitrogen)
- Bromuro de etidio
- Amortiguador de carga
- Cloroformo-Alcohol isoamílico: Proporción 49:2
- Kit de purificación de productos de PCR (GFX, GE)
- Kit de secuenciación: Big-Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (AB)
- Marcador de peso molecular: 3000 p.b. (Axygen)
- Oligonucleótido forward:5' GATGCTGGTTCTCTTTGTGG 3'
- Oligonucleótido reverso:5' CCCACTATCAGGAAGATGAG 3'
- SDS 10%: Dodecil sulfato de sodio (10g/1L)
- TBE 10x: Tris base (108g), EDTA (9.3g), Ácido bórico (55g), Agua (c.b.p. 1L)
- TTS: Tris 1M (1mL), Tritón 10x (1mL), Sacarosa (10.96g), Agua (c.b.p.1L)

b. Equipos y materiales

- Agitador: Daigger Vortex Gene 2
- Balanza: Denver Instrument Company AA-200
- Centrífuga: Eppendorf 5415D, Eppendorf 5810R
- Concentrador al vacío: Eppendorf 5301
- Cuantificador de DNA: AmpliQuant AQ-07
- Fotodocumentador BioRad
- Fuente de poder: Bio-Rad Power Pac 3000
- Secuenciador: ABI PRISM 3130
- Termociclador: Applied Biosystems 2720
- Transiluminador: DyNA Light

c. Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Polimorfismos presentes en el gen <i>PRNP</i> | 16 |
| Tabla 2. Mutaciones puntuales reportadas en el gen <i>PRNP</i> | 17 |
| Tabla 3. Clasificación de la CJD en el diagnóstico | 41 |
| Tabla 4. Enfermedades priónicas en animales..... | 47 |
| Tabla 5. Reactivos utilizados en la PCR | 52 |
| Tabla 6. Condiciones de la PCR | 53 |
| Tabla 7. Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación | 54 |
| Tabla 8. Condiciones de reacción de secuenciación..... | 54 |
| Tabla 9. Electroferogramas mostrando la mutación E200K..... | 58 |
| Tabla 10. Electroferogramas mostrando la mutación T188R..... | 59 |
| Tabla 11. Electroferogramas mostrando el polimorfismo M129V | 60 |
| Tabla 12. Variaciones encontradas en el gen <i>PRNP</i> | 61 |
| Tabla 13 Frecuencias alélicas y genotípicas en el codón 129..... | 62 |

d. Índice de ilustraciones

| | |
|---|----|
| Figura 1 Localización y estructura del gen <i>PRNP</i> | 11 |
| Figura 2 Estructura de la PrP ^C | 13 |
| Figura 4. Estructura lineal de la PrP ^C | 14 |
| Figura 3 PrP ^C madura insertada a la membrana celular..... | 14 |
| Figura 5. Mutaciones descritas en el gen <i>PRNP</i> | 19 |
| Figura 6. Estructura del <i>locus PRNP</i> | 24 |
| Figura 7. Estructura lineal de Doppel..... | 24 |
| Figura 8. Estructura de Shadoo..... | 25 |
| Figura 9. Modelo propuesto de interacción entre Shadoo y PrP ^C | 26 |
| Figura 10. Expresión del gen <i>PRNP</i> en el cuerpo humano. | 27 |
| Figura 11. Cambios consecuentes a la transformación de PrP ^C en PrP ^{Sc} | 28 |
| Figura 12. Modelo de interacción de PrP ^C con oligómeros de proteína β-amiloide.. | 30 |
| Figura 13. Estructura tridimensional de la PrP ^C , PrP ^{Sc} y una protofibrilla de PrP ^{Sc} .. | 33 |
| Figura 14. Modelo de replegamiento. | 34 |
| Figura 15. Modelo de la semilla..... | 34 |
| Figura 16. Características histopatológicas de las enfermedades priónicas heredables..... | 36 |
| Figura 17. Edad de inicio y duración de la enfermedad..... | 37 |
| Figura 18. Edad de inicio de sCJD y vCJD..... | 41 |
| Figura 19. Mecanismos propuestos de entrada e invasión de la PrP ^{Sc} en la vCJD.. | 43 |
| Figura 20. Metodología general..... | 49 |
| Figura 21. Género y edad de los pacientes | 56 |
| Figura 22. Distribución de la edad de inicio de la enfermedad en los pacientes | 56 |
| Figura 23. Integridad del DNA genómico..... | 57 |
| Figura 24. Resolución de los productos de PCR mediante electroforesis | 58 |
| Figura 25. Mutaciones encontradas y polimorfismos asociados..... | 62 |
| Figura 26. Ubicación espacial de E200 en la proteína prión..... | 63 |
| Figura 27. Ubicación espacial de T188 en la proteína prión..... | 65 |
| Figura 28. Ubicación espacial de M129 en la proteína prión. | 66 |