

***EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO EN EL CODÓN 129  
DEL GEN PRNP: ESTUDIO PILOTO***

**DAVID E. SANTAMARIA BUITRAGO.**

**MAGDA CAROLINA SANCHEZ, MSc**

**DIRECTORA**

**VICTORIA EUGENIA VILLEGAS, MSc**

**CODIRECTORA**

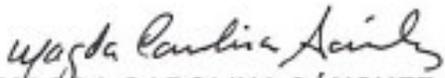
Trabajo presentado como requisito parcial para obtener el grado de Magister en  
Ciencias con énfasis en Genética Humana

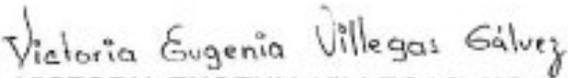
UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

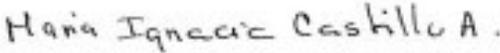
2011

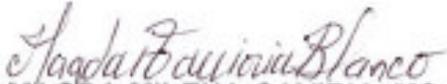
**EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO EN EL CODÓN 129  
DEL GEN PRNP: ESTUDIO PILOTO**

**DAVID E. SANTAMARIA BUITRAGO**

  
**MAGDA CAROLINA SÁNCHEZ, MSc**  
**DIRECTORA**

  
**VICTORIA EUGENIA VILLEGAS, MSc**  
**CODIRECTORA**

  
**MARÍA IGNACIA CASTILLO, PhD**  
**JURADO**

  
**MAGDA MILENA GAVIRIA, MSc**  
**JURADO**

*A mis padres Lucía y Carlos, porque sin su apoyo,  
confianza y ánimo esto no habría sido posible.*

*A mis amigos, que con su buen ánimo me ayudaron a  
seguir adelante con este trabajo.*

## Agradecimientos

A la doctora Carolina Sánchez, quien desde el primer momento en el que llegué a su oficina me ayudó y apoyó con el trabajo.

A la doctora Vicky, quien fue un apoyo en lo académico y en lo personal, muchas gracias a ella.

A María Martínez quien me colaboró, ayudó y confió en mí desde el mismo momento en el que comenzamos a trabajar juntos.

A la doctora Lilian, porque con sus consejos encontré tranquilidad.

Y de nuevo a mis padres que sin ellos nada de esto ni muchas cosas en mi vida hubieran sido posibles.

GRACIAS

## Tabla de contenido

1	Resumen .....	7
2	Abstract .....	8
3	Introducción.....	9
4	Marco teórico .....	12
4.1	Generalidades .....	12
4.2	Epidemiología .....	16
4.3	Manifestaciones clínicas .....	18
4.4	Estructura del gen PRNP .....	19
4.5	Proteína priónica .....	20
4.6	Funciones de la PRP <sup>C</sup> .....	22
4.7	Conversión de la PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>Sc</sup> .....	24
4.8	Genética molecular de las enfermedades priónicas .....	25
5	Objetivos .....	28
5.1	Objetivo general .....	28
5.2	Objetivos específicos .....	28
6	Hipótesis .....	28
7	Justificación .....	29
8	Materiales y métodos.....	31
8.1	Muestreo.....	31
8.2	Extracción de DNA.....	31
8.3	Amplificación .....	31
8.4	Verificación del producto amplificado.....	32
8.5	Restricción del producto amplificado.....	32
8.6	Análisis de datos .....	32
9	Resultados .....	34
10	Discusión de resultados .....	42
11	Conclusiones.....	49
12	Recomendaciones .....	51
13	Referencias.....	53

## Figuras

Figura 1. Esquema de las proteínas priónicas. ....	13
Figura 2. Mapa de los países confirmados con enfermedades con priones. ....	15
Figura 3. Posiciones de las mutaciones y los polimorfismos del gen PRNP.....	19
Figura 4. Diagrama de la proteína priónica. ....	21
Figura 5. Simulación de la localización y anclaje de la PrP <sup>C</sup> en la membrana celular .....	22
Figura 6. Interacción entre la membrana celular y PrP.....	23
Figura 7. Conversión espontánea, adquirida y hereditaria de PrP.....	24
Figura 8. Verificación de la amplificación del fragmento de PRNP.....	34
Figura 9. Verificación de la restricción del producto de PRNP. ....	35
Figura 10. Mapa de Europa y el norte de África con las frecuencias genotípicas de los países incluidos en este trabajo marcadas. ....	47

## Tablas

Tabla 1. Número de casos reportados para CJD en los últimos años.....	17
Tabla 2. Distribución del polimorfismo para el codón 129 para la población estudiada. ....	36
Tabla 3. Comparación del ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) de las frecuencias del polimorfismo para el codón 129 en diferentes poblaciones. ....	37
Tabla 4. Diferenciación génica y genotípica entre pares de poblaciones mediante el test exacto G .....	40
Tabla 5 Estadísticos F globales. ....	41
Tabla 6. Valores de F <sub>ST</sub> por pares de poblaciones. ....	42
Tabla 7. Estadísticos F globales excluyendo la población coreana.....	48

## 1 Resumen

Las enfermedades causadas por priones, llamadas encefalopatías espongiformes transmisibles, son el producto de la conversión espontánea de la proteína celular PrP<sup>C</sup> inofensiva en su forma patógena, la PrP<sup>Sc</sup>. Todavía se desconoce cómo se lleva a cabo esta conversión, aunque se conocen mutaciones que pueden inducirla debido a la interacción con las partículas priónicas. También se han reportado polimorfismos que aumentan la susceptibilidad al desarrollo de este tipo de enfermedades, entre ellos, el M129V en el gen PRNP, el cual se asocia con el aumento de la susceptibilidad cuando el incluye el genotipo homocigoto para metionina.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar la distribución del polimorfismo M129V en la población colombiana y compararla con algunas poblaciones reportadas previamente en la literatura. El fragmento que alberga la variante M129V fue amplificado por PCR, en 202 individuos colombianos, no relacionados, de ambos géneros, y se llevó a cabo análisis por RFLPs mediante el uso de la enzima de restricción *NspI*. Las frecuencias génicas y genotípicas y el ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg fueron calculadas utilizando el software GENEPOP.

Al no encontrarse estudios en la población colombiana en cuanto a la distribución del polimorfismo de estudio, es necesario realizar trabajos que determinen el

riesgo de la población colombiana a desarrollar enfermedades causadas por priones.

## **2 Abstract**

The diseases caused by prions, called transmissible spongiform encephalopathies, are the product of a spontaneous conversion of the innocuous cell protein PrP<sup>C</sup> into its pathogen form, the PrP<sup>Sc</sup>. It is still unknown how this conversion is undertaken, although there are known mutations that might induce it due to the interaction with prionic particles. There are also polymorphisms which increases the susceptibility to course with this type of diseases. The M129V polymorphism on the PRNP gene is associated with the susceptibility increase when the homozygous genotype for Methionine is found. The aim of this study is to analyze the distribution of the M129V polymorphism in the Colombian population and to compare it with some populations reported in the literature. In the present study the fragment that harbors the M129V variant was amplified by PCR, in 202 unrelated Colombian individuals of both genders. The RFLPs were done by using the restriction enzyme *NspI*. The genic and genotypic frequencies and the adjustment to the Hardy-Weinberg equilibrium were calculated using the GENEPOP software. This study shows that the distribution of the M129V polymorphism in the Colombian population is similar to Spanish and Danish and different from the other Caucasian ones, also it is different from the Korean population, the only Asian population included in the analysis. As a conclusion, it can be said that the distribution of the

polymorphism in the Colombian population is similar to others because the allele that codifies for Methionine is the most frequent on the population. Furthermore no geographical, historical, or genetic gradient can be established since some populations that are close in the geographical and historic way showed statistical differences on their frequencies, while some that are not close enough, show similarities on their frequencies. The risk of the Colombian population to develop prion diseases is not known so far.

### **3 Introducción**

Las enfermedades producidas por priones o encefalopatías espongiformes transmisibles como también son conocidas, tienen como característica fundamental la agregación en el cerebro de una proteína cuya estructura terciaria ha sido modificada por diversas causas; este tipo de patologías se presentan en algunos animales y en humanos.

La causa de las encefalopatías espongiformes transmisibles puede ser esporádica, familiar o hereditaria y adquirida o iatrogénica.

Las enfermedades son:

- Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)
- Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)
- Insomnia familiar fatal (IFF)
- Kuru

- Variante CJD (vCJD)

Estos agregados proteínicos en el cerebro se dan a consecuencia de la conversión de la PrP<sup>C</sup> como es conocida la forma de la proteína normal en la PrP<sup>Sc</sup> como es llamada la forma patógena; dichos agregados se acumulan debido a que la PrP<sup>Sc</sup> es una proteína que no se degrada en su totalidad y se estima que el núcleo que permanece estable es el que posee el factor que favorece el cambio de conformación entre los tipos de proteínas.

Aunque en la mayoría de los casos estos cambios son esporádicos, se encuentran casos familiares que se deben a mutaciones y/o polimorfismos en el gen PRNP, que es el que codifica para la proteína priónica.

A nivel de la proteína se ha encontrado que las personas que presentan un genotipo MM, tienen una mayor cantidad de láminas plegadas  $\beta$ , al igual que si presentan el genotipo VV, lo cual está asociado con la presentación de la enfermedad (Palmer *et al.* 1991, Mackay *et al.* 2011) Pero si tienen el genotipo MV, la proteína exhibe una mayor cantidad de alfa hélices, lo cual parece está relacionado con la protección a la enfermedad.

En cuanto a las generalidades del gen, éste se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 20. Posee 2 exones, de los cuales el segundo es el que codifica para la proteína.

Para este gen se han descrito múltiples mutaciones y polimorfismos. Mutaciones que están plenamente asociadas con fenotipos específicos y polimorfismos como

por ejemplo el estudiado en el presente trabajo que funciona como modificador de fenotipo.

Como se menciona anteriormente, este trabajo se centro en el estudio del polimorfismo ubicado en la posición 129 en el cual el aminoácido Metionina es cambiado por el aminoácido Valina. Este polimorfismo está involucrado tanto en la susceptibilidad a la enfermedad como en la modificación del fenotipo de la enfermedad.

## 4 Marco teórico

### 4.1 Generalidades

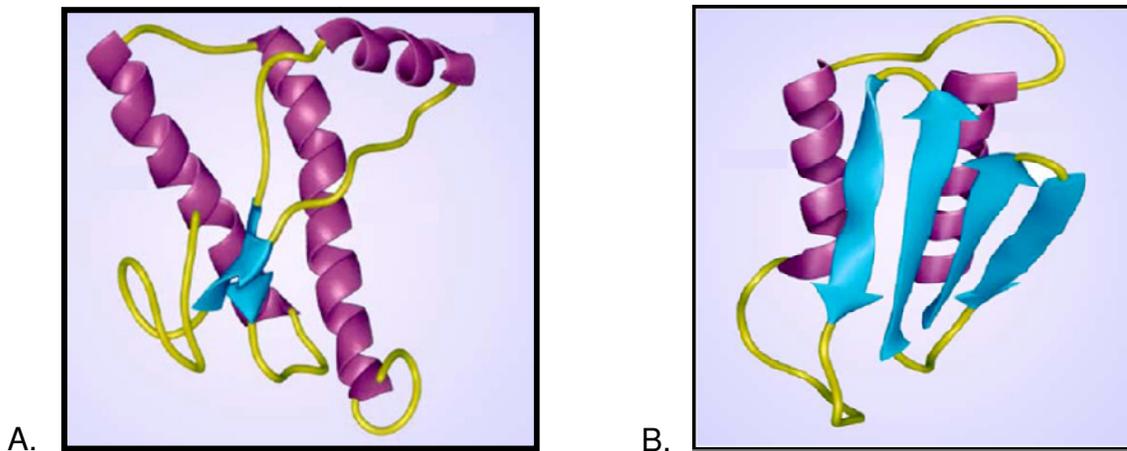
Las encefalopatías espongiformes transmisibles constituyen un grupo de enfermedades neurodegenerativas. Se presentan en animales y humanos y son producidas por el metabolismo alterado de la proteína priónica (PrP<sup>Sc</sup>).

Estas patologías se caracterizan por presentar periodos prolongados de incubación, así como transmisibilidad entre especies y evolución clínica fatal, lo que ha llevado a considerálas como un problema de salud pública mundial.

Stanley Prusiner en 1982 propuso por primera vez su hipótesis del prion, al investigar una serie de patologías que afectan el sistema nervioso central, y encontrar una categoría nueva de agentes causante de enfermedad, compuesto de proteínas al cual le dio el nombre de Prion, término, cuyo significado en inglés es "*proteinaceous infectious particle*" (Prusiner, 1982). Los priones a diferencia de los agentes infecciosos (virus bacteria, hongos, parásitos, etc.) no contienen ácidos nucleicos y están compuestos por aminoácidos (Griffith, 1967).

En los seres humanos los priones son proteínas (PrP) que se encuentra ancladas a la membrana celular de muchos tejidos, entre ellos músculo esquelético, células dendríticas foliculares, plaquetas y células endoteliales siendo su mayor concentración en las neuronas (Prusiner 1998), donde actúan en el correcto desarrollo neuronal regulando procesos de adhesión celular, transmisión de señales y protección contra el estrés oxidativo.

Esta proteína se encuentra glicosilada y unida a la superficie externa de la membrana celular por una molécula de glucofosfatidilinositol (GPI) y está relacionada con las balsas lipídicas de la membrana celular (Vey *et al.*, 1996). La proteína PrP presenta dos isoformas: la no patológica PrP<sup>C</sup> cuyos dominios principales son hélices- $\alpha$  (Figura 1 A) y es sensible a métodos de degradación convencionales tales como proteasas o rayos UV; y la forma patológica PrP<sup>Sc</sup>, que tiene dominios  $\beta$ -pliegues (Figura 1 B) y es resistente a las proteasas y a los rayos ultravioleta (Safar *et al.*, 1993).



**Figura 1.** Esquema de las proteínas priónicas. A. proteína priónica celular. B. proteína patológica (Tomado y modificado de Prusiner, 2001)

Todas estas enfermedades son el resultado de la agregación de la proteína (PrP<sup>C</sup>) en su forma patológica (PrP<sup>Sc</sup>) que poseen características comunes,

presentándose periodos de incubación bastante largos (meses o años), apareciendo progresivamente síntomas neurológicos de carácter progresivo.

Estas infecciones no son exclusivas de los humanos. Los ungulados presentan enfermedades priónicas conocidas desde hace muchos años, dentro de estas están: *Scrapie* en ovejas, *chronic wasting disease* en alces y venados y encefalopatía espongiforme bovina (ESB). Esta última es la famosa enfermedad de “las vacas locas”, en la cual las vacas después de ser alimentadas con productos contaminados con priones presentaban un comportamiento extraño (Johnson *et al.*, 1998).

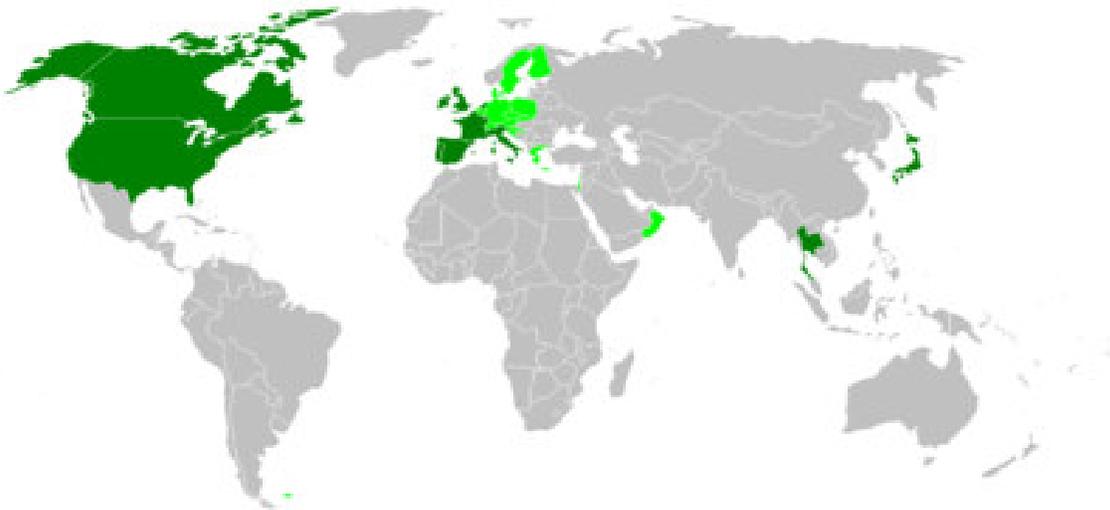
En el Reino Unido, el país que más afectado se vio por el último brote de esta enfermedad, se comprobó la infección en más de 180.000 cabezas de ganado y alrededor de 4,5 millones fueron sacrificadas durante el programa de erradicación (Brown *et al.*, 1987)

El descubrimiento de que la ESB es transmisible a otras especies animales ha elevado el interés a nivel mundial de este tipo de enfermedades. (Figura 2).

En el hombre se han descrito entidades como: La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (sCJD), y su variante la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). La CJD tiene dos presentaciones una esporádica de prevalencia baja y una de presentación familiar. También se han descrito la variante CJD (vCJD) que se presenta por la ingesta de carne infectada con ESB y la forma iatrogénica (iCJD), que resulta del uso de instrumentos quirúrgicos contaminados, transplantes de cornea o dura madre (Will, 2003) y la insomnia familiar fatal (IFF) y

de carácter adquirido como Kuru, que se dio en la isla de Papúa Nueva Guinea debido a rituales canibalísticos (Mead *et al.*, 2003)

Las personas que se ven afectadas por alguna de estas enfermedades mueren pocos meses después de la presentación de los síntomas (Haywood, 1997) y los resultados patológicos, comprueban la muerte de las neuronas y apariencia esponjiforme del tejido cerebral.



**Figura 2.** Mapa de los países confirmados con enfermedades con priones. El verde oscuro representa los países confirmados con enfermedad por priones (vCJD). El verde claro muestra los países en los que se han reportado casos con ESB. Aunque existen varios lugares en el mundo donde se ha presentado la ESB, gracias a su descubrimiento se logró detener su expansión evitando una epidemia de (vCJD) (Tomado de [http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine\\_spongiform\\_encephalopathy](http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_spongiform_encephalopathy)).

## 4.2 Epidemiología

Creutzfeldt-Jakob (CDJ) es la más común de las enfermedades causadas por priones en humanos, con una incidencia de 0,5 a 1,5 casos por millón de personas por año a nivel mundial (Johnson & Gibbs, 1998).

El 85% de los casos es de la forma esporádica, del 10 al 15% de los casos son de la forma familiar, y el 1% son de la forma adquirida o iatrogénica (Haywood, 1997).

Este grupo de enfermedades afecta tanto hombres como mujeres por igual, se presentan en promedio a los 60 años, siendo poco frecuente que se produzca antes de los 40 o pasados los 80. La mortalidad es del 90% al cabo de 1 año después de que manifiesten los síntomas (Johnson & Gibbs, 1998).

En la Tabla 1 se muestra los casos confirmados y algunos pendientes de confirmar de enfermedades por priones reportados hasta el momento. se aprecia que el número de casos confirmados es bajo, lo que se puede deber a que este tipo de patologías comparte signos y síntomas con otros tipos de enfermedades neurodegenerativas y podrían estar subdiagnosticadas.

**CASOS EXAMINADOS DE ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR PRIONES<sup>1</sup>. AGOSTO 2011**

Año	Total de referidos <sup>2</sup>	Enfermedad por priones	Esporádicos	Familiares	Iatrogénicos	vECJ
1996 o antes	51	33	28	5	0	0
1997	114	68	59	9	0	0
1998	88	52	43	7	1	0
1999	122	74	65	8	1	0
2000	145	103	89	14	0	0
2001	210	120	110	10	0	0
2002	248	149	125	22	2	0
2003	274	176	137	39	0	0
2004	325	186	164	21	0	1 <sup>3</sup>
2005	344	194	157	36	1	0
2006	382	196	166	28	0	2 <sup>4</sup>
2007	376	212	186	26	0	0
2008	396	232	206	26	0	0
2009	423	256	213	43	0	0
2010	412	256	215	41	0	0
2011	216	134	105	21	0	0
Total	4126 <sup>5</sup>	2441 <sup>6</sup>	2068	356	5	3

**Tabla 1.** Número de casos reportados para CJD en los últimos años. (Tomado y modificado de *National Prion Disease Pathology Surveillance Center*. 2011 <http://www.cjdsurveillance.com/index.html>). <sup>1</sup>Lista basada en el año de la muerte o, si no disponible, en el año de referencia; <sup>2</sup> casos con sospecha de enfermedad por priones para los cuales tejido cerebral y/o muestra de sangre (en los casos familiares) fue enviado; <sup>3</sup> enfermedad adquirida en el Reino Unido; <sup>4</sup> la enfermedad fue adquirida en un caso en el Reino Unido y en el otro en Arabia Saudita; <sup>5</sup> incluye 8 casos en los cuales el diagnóstico está pendiente y en 19 fue inconcluso; <sup>6</sup> 9 casos (8 del 2011) con diagnóstico pendiente en los cuales el diagnóstico de vECJ ha sido excluido.

### 4.3 Manifestaciones clínicas

Las enfermedades producidas por priones comparten muchas manifestaciones clínicas entre ellas y con otras enfermedades neurodegenerativas propias del envejecimiento lo que dificulta su correcto diagnóstico (Johnson & Gibbs, 1998)

#### 4.3.1 CJD esporádica, familiar e iatrogénica

- Fatiga física
- Insomnio
- Cambios de comportamiento
- Pérdida de la agudeza visual
- Ataxia
- Afasia

#### 4.3.2 Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

- Ataxia progresiva
- Paraparesia espástica
- Mioclonías
- Demencia de aparición tardía

#### 4.3.3 Insomnio familiar fatal (IFF)

- Insomnio progresivo
- Demencia tardía

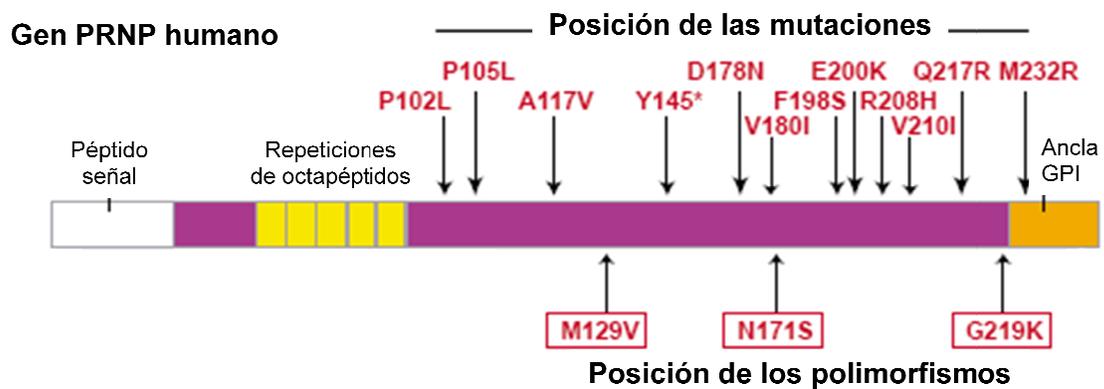
#### 4.3.4 Kuru

- Ataxia progresiva
- Cambios cognitivos en estados avanzados

#### 4.4 Estructura del gen PRNP

El PRNP humano está localizado en el brazo corto del cromosoma 20 (20p12), tiene 2 exones separados por un intrón de 12.696pb. El exón I tiene 134pb y corresponde a la región UTR en 5'. El exón II tiene 2.355pb y tiene un ORF de 759 nucleótidos, el cual codifica la proteína en su totalidad (Kretzschmar *et al.*, 1986).

El gen también contiene 5 octarrepeticiones en tándem, ubicadas entre los codones 51 y 91, que constituyen sitios específicos para la unión de iones metálicos (Figura 3; McKinley *et al.*, 1991).



**Figura 3.** Posiciones de las mutaciones y los polimorfismos del gen PRNP (Tomado y modificado de Manson & Tuzi, 2001)

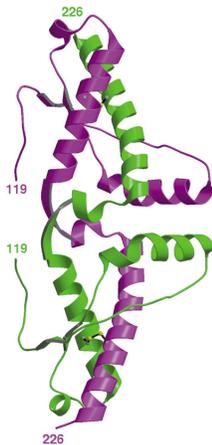
#### 4.5 Proteína priónica

El gen PRNP codifica para un polipéptido que consiste de 253 aminoácidos y se ha encontrado en la mayoría de las células, principalmente en las neuronas (Prusiner, 2001).

La PRNP es sintetizada en los ribosomas del retículo endoplásmico (ER) y durante su maduración la proteína sufre las siguientes modificaciones post-traduccionales:

1. Una vez dentro del ER fragmenta la secuencia señal de 22 aminoácidos del extremo N-terminal correspondientes a la señal de síntesis proteica en ribosomas asociados al ER y es translocada a la luz del ER, allí remueve la secuencia que corresponde a los aminoácidos 232-253 del extremo C-terminal. Luego del procesamiento de los extremos N-C terminal la proteína posee un total de 209 aminoácidos (Harris, 2003).
2. El dominio C-terminal, contiene un segmento de aminoácidos hidrofóbicos que es una señal para la incorporación de las cadenas de oligosacáridos conocidas como glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Prusiner ,1998). Este GPI sirve para que se una covalentemente a los lípidos de la membrana plasmática.
3. Otras modificaciones que se realizan en el ER son dos N-glicosilaciones en las asparaginas 181 y 197.
4. Finalmente cabe destacar la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 174 y 214.

La estructura tridimensional de la proteína PRNP estudiada principalmente por resonancia magnética nuclear (RMN), posee un dominio N-terminal, con regiones que contiene de 5 a 6 repeticiones del octapéptido PHGG(G/S)WGQ entre los residuos 60 y 93, y la secuencia homóloga que ha perdido un residuo de histidina (PQGGGWGQ entre los residuos 52 y 60) Estos dominio, junto con los dos residuos de histidina en las posiciones 96 y 111, constituyen el sitio de unión al cobre. Por otra parte el dominio N-terminal contiene una secuencia palindrómica AGAAAAGA, que juega un papel importante en la fibrillogénesis, o formación de fibras amiloides (Jobling *et al.*, 1999).



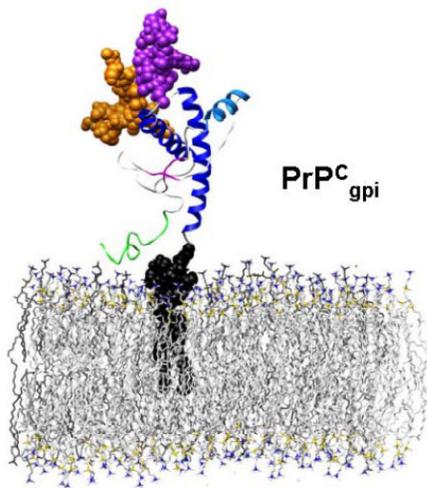
**Figura 4.** Diagrama de la proteína priónica. Las cadenas peptídicas en verde y morado, se muestran sus extremos N y C terminal. Los dos puentes disulfuro se ven en forma de átomos y cintas (Tomado de Knaus *et al.*, 2001)

El segmento central rico en aminoácidos hidrofóbicos (aminoácidos 110/113 a 128), que constituye su región transmembranal y un extremo C-terminal

compuesto por 3 hélices- $\alpha$  y un motivo pequeño de  $\beta$ -pliegues. Las hélices 2 y 3 se estabilizan por medio del puente disulfuro que se encuentra entre las cisteínas 179 y 214 (Figura 4; Prusiner *et al.*, 1998)

En este extremo C-terminal, también se encuentra localizada la molécula GPI la cual sirve para anclar la proteína a la membrana celular (

Figura 5; Zahn *et al.*, 2000).

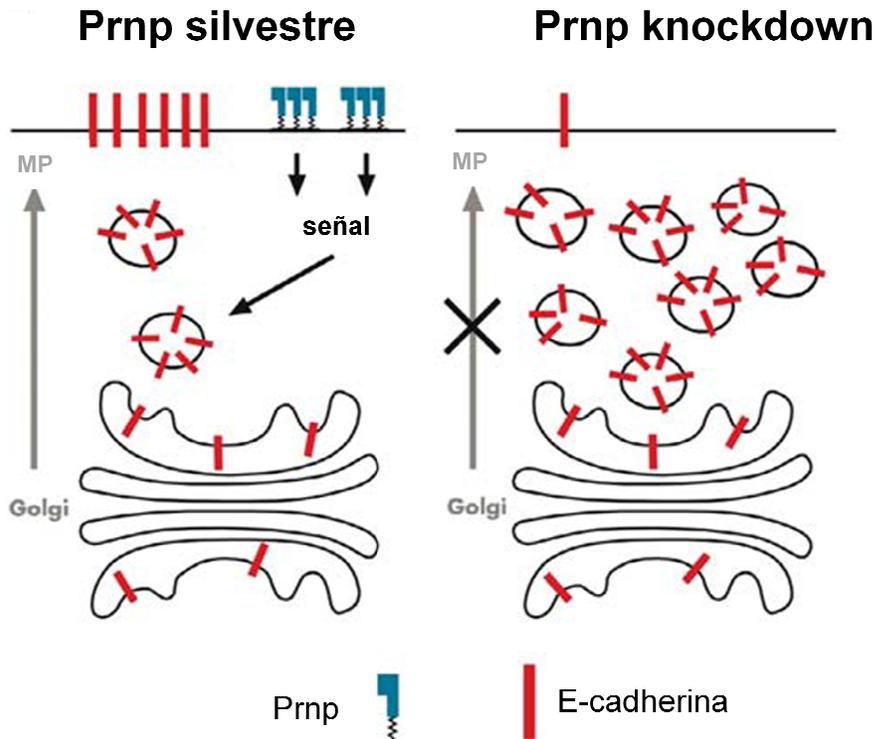


**Figura 5.** Simulación de la localización y anclaje de la PrP<sup>C</sup> en la membrana celular (Tomada de DeMarco & Daggett, 2009)

#### 4.6 Funciones de la PRP<sup>C</sup>

El rol fisiológico de la proteína celular no se ha establecido claramente, pero algunas de las funciones potenciales que podría tener la PrPC son de señalización

y de transporte (Graner *et al.*, 2000; Madore *et al.*, 1999) adhesión y diferenciación celular (Brown *et al.*, 2001), metabolismo del cobre (Meggio *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001), entre otras (Figura 6).

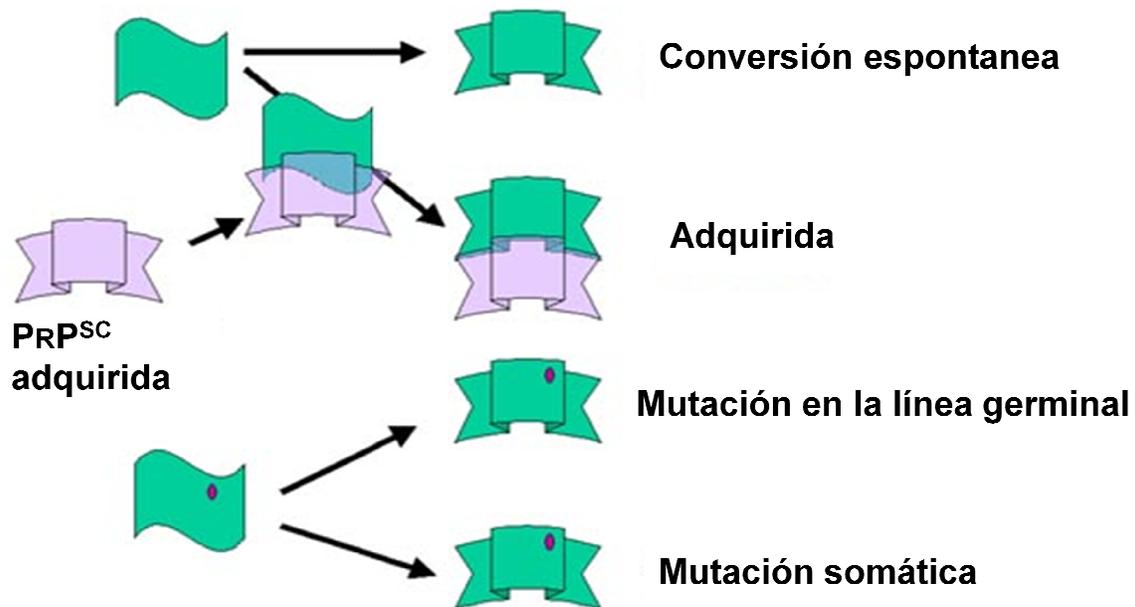


**Figura 6.** Interacción entre la membrana celular y PrP. Esta imagen muestra el escenario de una membrana desprovista de la PrP, en el cual no se transmite la señal para que las E-cadherinas ejerzan su función en la adhesión celular (izquierda), pero cuando la PrP está presente en la membrana, si se presenta la señal y las E-cadherinas funcionan normalmente (derecha) (Tomado y modificado de Chiesa & Harris, 2009).

#### 4.7 Conversión de la PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>

Esta conversión puede ocurrir espontáneamente o a consecuencia de mutaciones en el gen PRNP. Estas mutaciones causan inestabilidad en la estructura de la PrP<sup>C</sup> (Pauly & Harris, 1998).

Existen varios modelos que explican la manera en la que se convierte la proteína celular en su forma patógena, pero el más aceptado es el que involucra una proteína intermediaria o cofactor que cataliza dicha conversión. Esta proteína accesoria normalmente es llamada “proteína X” (Foster & Hunter, 1998; Figura 7). Este modelo indica que las unidades infecciosas no son monómeros de la PrP<sup>Sc</sup> sino pequeños oligómeros de ésta (Gambetti *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Conversión espontánea, adquirida y hereditaria de PrP. Se muestra la conversión espontánea, adquirida y hereditaria de la proteína normal en la anormal (Tomado y modificado de Hunt, 2006)

Otro modelo describe un equilibrio entre las concentraciones de las dos proteínas. Si la forma patógena iguala la concentración de la no patógena, entonces el evento replicativo se lleva a cabo, es decir, a partir de una molécula de PrP<sup>C</sup> se forman las nuevas moléculas de PrP<sup>Sc</sup> (Abid & Soto, 2006).

La conversión se lleva a cabo ya sea en las balsas lipídicas de la membrana celular, o en los compartimentos endosomales (Aguzzi, 2009).

Se ha probado *in vitro* que la conversión puede ser bloqueada por polianiones sulfatados. Se cree que este bloqueo se produce por inhibición competitiva entre las dos formas de la proteína (Marijanovic *et al.*, 2009; Horonchik *et al.*, 2005).

En la forma espontánea no se sabe cómo se produce dicha conversión, pero en la adquirida es necesario haber entrado en contacto con alguna partícula priónica para que se produzca el evento de conversión. En la heredada se hereda alguno de los factores de susceptibilidad a la enfermedad, pero aun así deben darse las condiciones necesarias para presentar el fenotipo de alguna de ellas.

#### 4.8 Genética molecular de las enfermedades priónicas.

Como se mencionó previamente, la incidencia de la forma esporádica de las enfermedades producidas por priones es de 1/1.000.000 personas por año, mientras que la familiar presenta 1/10.000.000 por año (Brown *et al.*, 1987).

De las diferentes mutaciones reportadas para el gen, sólo cuatro (P102L, D178N, E200K y una inserción de 144-pb) han mostrado una frecuencia lo suficientemente alta como para generar *LOD scores* para su asociación. Adicionalmente, existen polimorfismos que modifican los fenotipos de las enfermedades. (Hill *et al.*, 2009). Entre estos se encuentra el polimorfismo para Metionina (ATG) o Valina (GTG) en el codón 129 del gen PRNP. Este polimorfismo se ha visto asociado con la reducción de la materia blanca (Rujescu *et al.*, 2002), desempeño cognitivo (Croes *et al.*, 2003; Del Bo *et al.*, 2003; Rujescu *et al.*, 2002) y la memoria a largo plazo (Papassotiropoulos *et al.*, 2005).

En población caucásica americana este polimorfismo presenta una frecuencia alélica de 0.66 para Metionina, mientras que para Valina es de 0.34. La distribución del genotipo en este tipo de población es de 37% Met/Met, 51% Met/Val y 12% Val/Val (Owen *et al.*, 1990).

Dentro de los casos de la forma esporádica (sCJD) el 71.6% de las personas que lo presentan tienen un genotipo MM, 11.7% tienen MV, y 16.7% son VV (Parchi *et al.*, 1999).

Este polimorfismo tiene un papel modificador de fenotipo, ya que con la presencia de la mutación puntual se presentan dos fenotipos IFF y CJD. El primero se presenta cuando el genotipo es 178N-129M y el segundo con el genotipo 178N-129V (Goldfarb *et al.*, 1992; Montagna *et al.*, 2003).

Es de gran importancia el análisis de polimorfismos que estén asociados a enfermedades ya que puede dar indicios sobre la susceptibilidad que una persona

puede presentar a alguna patología en un futuro. En este momento los datos reportados en la literatura son principalmente europeos y los que se reportan hasta el momento en América se refieren exclusivamente a población norteamericana por lo que este trabajo se constituye en una primera aproximación a los datos de este polimorfismo para población latinoamericana.

## **5 Objetivos**

### 5.1 Objetivo general

Determinar y analizar la distribución del polimorfismo M129V en la población de estudiantes de primer y segundo semestre de la escuela de medicina y ciencias de la salud, y compararlos con los datos reportados a nivel mundial en estudios similares.

### 5.2 Objetivos específicos

Estandarizar la técnica de PCR para la amplificación y restricción del polimorfismo Metionina129Valina del gen PRNP.

Determinar las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo M129V de la muestra estudiada.

Verificar si la población de estudio se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Comparar los resultados obtenidos con los previamente reportados para otras poblaciones.

## **6 Hipótesis**

- Las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo M129V son significativamente diferentes a las observadas en otras partes del mundo
- Las frecuencias génicas y genotípicas del polimorfismo M129V son similares a las observadas en otras partes del mundo

## 7 Justificación

Las enfermedades producidas por priones, también llamadas encefalopatías espongiformes transmisibles, son desordenes neurodegenerativos que se caracterizan por la acumulación en el cerebro de la forma patógena de la proteína Prnp. Dentro de sus manifestaciones clínicas se encuentran demencia, ataxia, insomnio y mioclonías, entre otras.

De igual manera presentan características neuropatológicas que incluyen pérdida neuronal, vacuolización de neuronas, cambios espongiformes y la presencia de placas amiloides.

Estas enfermedades por lo general tienen periodos de incubación que van desde meses hasta años antes de que se presente algún signo ya que no evocan respuesta inmune ni inflamatoria por parte del huésped. Cuando son detectadas, la muerte es inminente y ocurre en un corto periodo de tiempo, generalmente en pocos meses (Hill *et al.*, 2003).

En Colombia no existen datos estadísticos de la incidencia de las enfermedades producidas por priones, sin embargo existen reporte de casos aislados, sobre todo en las regiones ganaderas de la geografía nacional (Duque-Velásquez *et al.*, 2010).

Su diagnóstico se hace difícil por el desconocimiento de estas enfermedades y por el temor al contagio que se pueda producir por ejemplo debido a que se han visto

casos en que ha habido transmisión por sangre. Este trabajo, pionero en Colombia, busca identificar la frecuencia del polimorfismo en el codón 129 de la proteína priónica el cual genera un cambio de ATG por CTG en dicha posición; esto se traduce en un cambio de Metionina por Valina. Este polimorfismo se ha visto asociado con la susceptibilidad a presentar la enfermedad Creutzfeldt-Jakob esporádica la cual representa el 85% de los casos por enfermedades por priones, de ahí su importancia a investigar (Pedersen & Smith, 2002).

La comparación de las frecuencias obtenidas con las reportadas a nivel mundial, permitió establecer si los datos de la población colombiana son similares a los reportados para este polimorfismo en otras poblaciones para el gen PRNP.

## 8 Materiales y métodos

### 8.1 Muestreo

En el trabajo se incluyeron hombres y mujeres voluntarios, mayores de edad que durante el periodo de muestreo (enero-diciembre de 2009) se encontraran estudiando sus dos primeros años en cualquiera de las carreras de la Escuela de medicina y ciencias de la salud de la Universidad del Rosario. A cada uno de los donantes se le tomó una muestra de sangre venosa por venopunción previo consentimiento informado.

### 8.2 Extracción de DNA

Después de obtenidas las muestras de sangre de los individuos se procedió a hacer la extracción de DNA genómico, por medio de la técnica *salting out* (Miller *et al.*, 1988).

### 8.3 Amplificación

La amplificación del fragmento de interés por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó utilizando los *primers* previamente reportados para la amplificación del fragmento (Li *et al.*, 2005)

PR1-F 5´ AAGCCTGGAGGATGGAACACTG 3´

PR1-R 5´ ATGCTCGATCCTCTCTGGTAAT 3´

Las condiciones de la PCR fueron 12.5µl de Go Tag® Green Master Mix (Promega), 20pM de cada uno de los *primers*, 100ng de DNA, en un volumen final de reacción de 25 µl.

La reacción se realizó en un termociclador PTC-150 (MJ Research) con las siguientes condiciones experimentales:

Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; 35 ciclos (94°C 45s, 62°C 45s, 68°C 60s) y una extensión final de 5 min a 68°C.

#### 8.4 Verificación del producto amplificado

La amplificación del producto de interés (617pb) fue verificada en gel de agarosa al 2.5%.

#### 8.5 Restricción del producto amplificado

La digestión teórica del fragmento fue verificada con el uso del software Rebase (Roberts *et al.*, 2010). Para la restricción se usaron 10 µl de producto amplificado y 0.25U/µl de la enzima *Nspl* (Li *et al.*, 2005). Se realizó una incubación por un periodo de 12 horas a 37°C.

#### 8.6 Análisis de datos

Las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo fueron calculadas usando el programa GENEPOP 4.0.10 (Rousset & Raymond, 1995).

A partir de estas frecuencias fue evaluado el equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando el mismo software y se compararon los resultados de este trabajo con los datos previamente reportados por otros autores en la literatura.

Es de aclarar que para las poblaciones que se usaron para hacer las comparaciones con la población colombiana, se les calcularon las frecuencias génicas, genotípicas y se verificó que estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

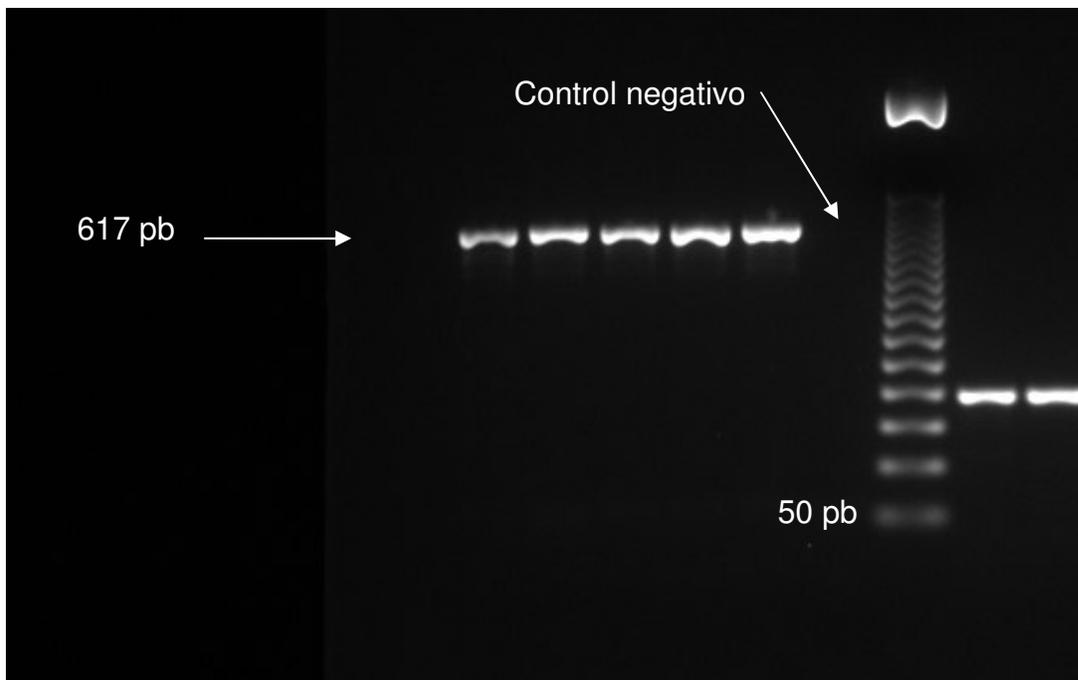
Se analizó la diferenciación génica y genotípica entre pares de poblaciones usando el método de Fisher (Fisher, 1935) y el test exacto G (Goudet *et al.*, 1996).

Se calcularon los estadísticos F de Wright globales (Weir & Cockerham, 1984) y por pares de poblaciones.

## 9 Resultados

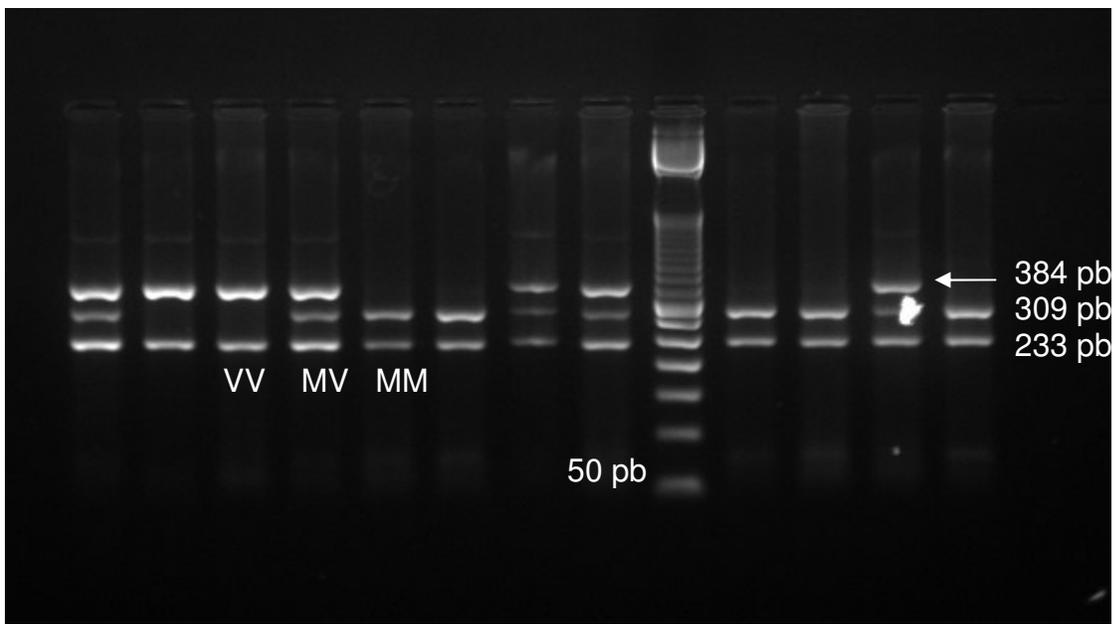
Se evaluó la distribución del genotipo del polimorfismo M129V en un total de 202 individuos cuyas edades están en el rango de los 18 a 22 años.

Se realizó verificación de la amplificación del fragmento de interés (Figura 8) el cual tiene 617 pares de bases.



**Figura 8.** Verificación de la amplificación del fragmento de PRNP. Puede observarse en la parte izquierda del gel la amplificación del producto de 617pb. Los productos a la derecha del marcador de peso molecular no se encuentran relacionados con este trabajo.

Tras la amplificación, se realizó y verificó la restricción de dicho producto con la enzima de restricción *NspI* (Figura 9). Como se observa en esta figura, los alelos M y V comparten la banda de 233pb. Las otras bandas son de 384 y 309 para Valina y Metionina respectivamente y el alelo para Metionina tiene una banda de 75pb que no se alcanza a evidenciar en el gel.



**Figura 9.** Verificación de la restricción del producto de PRNP. Se observan los patrones de restricción producto de la digestión con la enzima *NspI*. El alelo para Valina muestra dos bandas de 384 y 233 pb, mientras que el alelo para Metionina muestra las bandas de 309 y 233pb. La banda de 75 pb que se genera en la digestión del alelo Metionina no es visible en el gel.

Uno de los individuos heterocigotos fue secuenciado para verificar el genotipo y así ser usado como control de la digestión. En cada gel se incluyeron un control positivo (individuo secuenciado), uno negativo y marcador de peso molecular.

Las frecuencias genotípicas fueron MM (0.366), MV (0.485) y VV (0.149) y las frecuencias alélicas fueron 0.609:0.391 M:V (Tabla 2). A partir de estas frecuencias se verificó el ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 3).

Género	Número de individuos (Frecuencia genotípica)					Frecuencia alélica	
	Total	MM	MV	VV	No amplificación	M	V
<b>Femenino</b>	154	50 38.5%	62 47.7%	18 13.8%	24		
<b>Masculino</b>	74	24 33.3%	36 50.0%	12 16.7%	2		
<b>Total</b>	228	74 36.6%	98 48.5%	30 14.9%	26	0.609	0.391

**Tabla 2.** Distribución del polimorfismo para el codón 129 para la población estudiada. M: Metionina, V: Valina. Las frecuencias están calculadas usando únicamente los individuos con genotipificación positiva. No amplificación se refiere a DNAs que no amplificaron o fueron digeridos de manera parcial.

<b>Población</b>	<b>Número individuos</b>	<b>MM</b>	<b>MV</b>	<b>VV</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>EHW (p)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Dinamarca</b>	350	123 35,1%	167 47,7%	60 17,2%	0.51	0.49	0.9123	Dyrbye <i>et al.</i> , 2008
<b>Grecia</b>	348	175 50.2%	135 38.7%	38 10.9%	0.70	0.30	0.1634	Saetta <i>et al.</i> , 2006
<b>Corea</b>	529	500 94.5%	28 5.2%	1 0,19%	0.97	0.03	0.3449	Jeong <i>et al.</i> , 2004
<b>Polonia</b>	109	49 44.9%	43 39.4%	17 15.5%	0.65	0.35	0.6460	Bratosiewicz <i>et al.</i> , 1999
<b>Islandia</b>	208	97 46.6%	93 44.7%	18 8.7%	0.69	0.31	0.5223	Georgsson <i>et al.</i> , 2006
<b>Marruecos</b>	147	84 57.1%	53 36%	10 6.8%	0.66	0.34	0.5102	Nadifi <i>et al.</i> , 2008
<b>Turquía</b>	100	57 57.0%	34 34.0%	9 9.0%	0.74	0.26	0.2957	Erginel-Unaltuna <i>et al.</i> , 2001
<b>España</b>	110	47 42.7%	52 47.2%	11 10%	0.66	0.34	0.8193	Castellanos <i>et al.</i> , 2010
<b>Estados Unidos</b>	415	207 49.9%	176 42,4%	32 7,7%	0.71	0.29	0.5552	Li <i>et al.</i> , 2005
<b>Colombia</b>	202	74 36.6%	98 48,5%	30 14,8%	0.61	0.39	0.6565	

**Tabla 3.** Comparación del ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) de las frecuencias del polimorfismo para el codón 129 en diferentes poblaciones. En todos los casos la desviación estándar fue menor a 0.008 (valores no incluidos en esta tabla).

El genotipo MV fue más frecuente que el MM y VV tanto en hombres como en mujeres.

(Tabla 2). Esta La tabla muestra el número de individuos utilizados en este estudio separados por género. Aunque las mujeres presentaron un número mayor de individuos, se aprecia que esto no interfiere con la distribución de la frecuencia genotípica del polimorfismo al compararlo con el número de los hombres, esto está acorde con lo reportado por diferentes autores (Georgsson *et al.*, 2006).

Para analizar la distribución del polimorfismo en esta población se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas con las de otras poblaciones en las cuales se han realizado estudios similares; las frecuencias génicas de las poblaciones comparadas también se encuentran en EHW (Tabla 3).

Estos datos se obtuvieron mediante la evaluación del ajuste al EHW mediante test exactos y cadenas de Markov (Wright, 1969). En ninguno de los casos se encuentra una desviación estadísticamente significativa del equilibrio. También se evaluó el ajuste al EHW utilizando  $\chi^2$  y tampoco se observó desviación significativa del equilibrio.

La comparación de las frecuencias génicas y genotípicas (Tabla 4) del polimorfismo de estudio, muestra similitudes entre este trabajo y las poblaciones de Dinamarca y España; las poblaciones que más se asemejan en sus frecuencias son las de Turquía y Marruecos y la más diferente es la coreana.

<b>Par de poblaciones</b>		<b>Diferenciación Genotípica (p)</b>	<b>Diferenciación Génica(p)</b>
Grecia	Dinamarca	<b>0.00000</b>	<b>0.00006</b>
Islandia	Dinamarca	<b>0.00034</b>	<b>0.00060</b>
Islandia	Grecia	0.84870	0.82819
Corea	Dinamarca	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Corea	Islandia	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Marruecos	Dinamarca	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Marruecos	Grecia	0.10046	0.09056
Marruecos	Islandia	0.08929	0.08351
Marruecos	Corea	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Polonia	Dinamarca	<b>0.00263</b>	<b>0.00147</b>
Polonia	Grecia	0.87494	0.87057
Polonia	Islandia	0.78138	0.78835
Polonia	Corea	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Polonia	Marruecos	0.28302	0.26449
Turquía	Dinamarca	<b>0.00026</b>	<b>0.00002</b>
Turquía	Grecia	0.27212	0.26730
Turquía	Islandia	0.21705	0.20978
Turquía	Corea	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Turquía	Marruecos	0.92032	0.91790
Turquía	Polonia	0.46776	0.45550
Estados Unidos	Dinamarca	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Estados Unidos	Grecia	0.51586	0.53773
Estados Unidos	Islandia	0.41716	0.42469
Estados Unidos	Corea	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>

Par de poblaciones		Diferenciación Genotípica (p)	Diferenciación Génica(p)
Estados Unidos	Marruecos	0.21860	0.25216
Estados Unidos	Polonia	0.79937	0.79674
Estados Unidos	Turquía	0.43035	0.44097
España	Dinamarca	<b>0.02578</b>	<b>0.01775</b>
España	Grecia	0.73211	0.72981
España	Islandia	0.85479	0.84944
España	Corea	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
España	Marruecos	0.10708	0.10492
España	Polonia	0.67623	0.67363
España	Turquía	0.24150	0.22510
España	Estados Unidos	0.42127	0.43712
Colombia	Dinamarca	0.66993	0.64088
Colombia	Grecia	<b>0.00308</b>	<b>0.00213</b>
Colombia	Islandia	<b>0.01105</b>	<b>0.01241</b>
Colombia	Corea	<b>0.00000</b>	<b>0.00000</b>
Colombia	Marruecos	<b>0.00000</b>	<b>0.00003</b>
Colombia	Polonia	<b>0.02083</b>	<b>0.01618</b>
Colombia	Turquía	<b>0.00188</b>	<b>0.00056</b>
Colombia	Estados Unidos	<b>0.00003</b>	<b>0.00011</b>
Colombia	España	0.07853	0.06825

**Tabla 4.** Diferenciación génica y genotípica entre pares de poblaciones mediante el test exacto G (Goudet *et al.*, 1996). Valores en negrilla indican diferencia estadísticamente significativa con  $\alpha \leq 0.05$ .

La hipótesis de los estadísticos indica que las frecuencias génicas y genotípicas de las poblaciones son iguales entre sí. Se calcularon las diferencias entre pares de poblaciones mediante el método del test exacto G (Goudet *et al.*, 1996) y con el método de Fisher (valores no mostrados en la Tabla 4; Fisher, 1935). La hipótesis de este estadístico indica si la distribución de los alelos es igual en todas las poblaciones. Los valores mayores a 0.05, no son estadísticamente significativos, indicando así que las poblaciones con este valor serían similares entre sí (Goudet *et al.*, 1996).

$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
0.032937	<b>0.165375</b>	<b>0.192865</b>

**Tabla 5** Estadísticos F globales. Valores en negrilla indican diferencia estadísticamente significativa con  $\alpha \leq 0.05$ .

Los estadísticos F globales muestran que tanto la población de estudio como las reportadas muestran diferencias en las comparaciones globales (Tabla 5); y al revisar los datos de las comparaciones por pares de poblaciones se ve que la población coreana es diferente a todas las demás, y que se mantiene la similitud entre este estudio y las demás poblaciones (Tabla 6).

Para verificar la influencia de los resultados de la población de Corea, se recalcularon los valores de  $F_{ST}$  sin incluir esta población. Para probar la

significancia de los datos de Corea, la tabla 6 muestra que al comparar esta población con las demás se ve que los valores de p son estadísticamente significativos, mostrando que esa población es significativamente diferente a las demás poblaciones incluidas en este trabajo.

pop	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0.0227								
3	0.0191	0.0019							
4	<b>0.3919</b>	<b>0.2746</b>	<b>0.3315</b>						
5	0.0505	0.0042	0.0057	<b>0.2845</b>					
6	0.0233	0.0031	0.0031	<b>0.3824</b>	0.0012				
7	0.0436	0.0013	0.0025	<b>0.3319</b>	0.0044	0.0016			
8	0.0308	0.0008	0.0006	<b>0.2431</b>	0.0012	0.0027	0.0010		
9	0.0138	0.0029	0.0035	<b>0.4233</b>	0.0071	0.0039	0.0033	0.0008	
10	0.0015	0.0165	0.0134	<b>0.4397</b>	0.0428	0.0171	0.0361	0.0240	0.0086

**Tabla 6.** Valores de  $F_{ST}$  por pares de poblaciones. Valores en negrilla indican diferencia estadísticamente significativa con  $\alpha \leq 0.05$ . Poblaciones evaluadas: 1. Dinamarca, 2. Grecia, 3. Islandia, 4. Corea, 5. Marruecos, 6. Polonia, 7. Turquía, 8. Estados Unidos, 9. España, 10. Colombia.

## 10 Discusión de resultados

Para este estudio piloto, el número inicial de muestras de sangre fue de 228 (de igual número de individuos). Se obtuvieron resultados en un 88.6% de las

muestras utilizadas. Las que no amplificaron o dieron resultados parciales (26 individuos) no fueron incluidas. Como control de calidad del procedimiento se realizó cada experimento mínimo tres veces por muestra y en todos los casos se incluyó una muestra heterocigota, de secuencia conocida como control positivo.

El número final de trabajo consistió en 154 mujeres y 74 hombres cuyo rango de edad fue de 18 a 22 años en el momento de la toma de la muestra.

Este número podría no reflejar adecuadamente a la población colombiana, pero tomando en consideración los números de individuos que se analizaron en otros reportes publicados para poblaciones diferentes, es suficiente para una primera aproximación para el estudio del polimorfismo en Colombia, debido a que este se constituye en un estudio pionero ya que no se han encontrado datos reportados de este polimorfismo a nivel nacional, ni se cuenta con datos estadísticos de enfermedades producidas por priones (Duque-Velásquez, 2010). En lo referente a la restricción, la principal ventaja de la enzima usada (*NspI*) es que crea dos sitios de restricción en el fragmento amplificado para el alelo M y uno para V, lo que sirve como un control positivo de corte, ya que si se observa DNA sin digerir se sabe con certeza que el procedimiento debe repetirse porque el genotipo obtenido no es confiable. Adicionalmente, tal como se mencionó antes, como control positivo se utilizó una muestra que había sido secuenciada y mostró un genotipo heterocigoto para el polimorfismo analizado.

Con la información de los geles se calcularon las frecuencias génicas y genotípicas (Tabla 3), para evaluar el ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg

(EHW) y posteriormente compararlas con las de otros estudios similares reportados.

Cuando se hizo la evaluación del ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 3), se observó que la población colombiana de este estudio piloto se encuentra en EHW para el polimorfismo estudiado. Esto indica que no hay fuerzas selectivas actuando sobre la preferencia de ninguno de los alelos de este polimorfismo.

Al analizar el EHW en las otras poblaciones reportadas (Tabla 3), éstas también se encuentran en todos los casos en EHW lo cual indica que la selección de estos alelos es efectivamente aleatoria en estas poblaciones.

Por lo general los polimorfismos que se encuentran asociados a patologías no se ajustan al EHW debido a que los individuos tendrán una menor posibilidad de reproducción por su bajo *fitness* (Orr, 2009), sin embargo, esto no se cumple en las patologías que se manifiestan después de la edad reproductiva como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer o Parkinson (Martin, 1999), y en este caso las enfermedades producidas por priones ya que se manifiestan después de los 60 años (Nurmi *et al.*, 2003) y por lo tanto los alelos no se verían influenciados por una fuerza de selección o preferencia que pudiera influir en el paso de éstos a la siguiente generación.

El genotipo más frecuente en este estudio fue el heterocigoto MV con un 48.5%, seguido por el homocigoto para el alelo M con una frecuencia de 36.6% y con la frecuencia más baja VV. La frecuencia mayor del genotipo heterocigoto constituiría

un factor de protección para la población colombiana a presentar enfermedades producidas por priones.

En la población mundial la distribución de estos alelos es muy diversa. En general, para las poblaciones reportadas, el alelo M es más frecuente que el V. Algunas poblaciones como la Coreana (Jeong *et al.*, 2004) muestran frecuencias cercanas a cero para los homocigotos VV, mientras que en la población danesa la frecuencia del alelo V es cercana al 50% (Dyrbye *et al.*, 2008).

Respecto a las frecuencias genotípicas, en este estudio se encuentra la mayor frecuencia en los heterocigotos. Este patrón de altos números de heterocigotos se presenta también en las poblaciones de Dinamarca y de España (Dyrbye *et al.*, 2008; Castellanos *et al.*, 2010), pero en el resto de poblaciones, el genotipo más frecuente es el MM.

Podría especularse sobre el parecido de la distribución de las frecuencias que éste es consecuente con los patrones de migración y colonización de nuestro territorio debido a la similitud de la población muestreada en este estudio y la población española lo que se ve claramente en la Tabla 4 donde las diferenciaciones génicas y genotípicas son comparadas por pares de poblaciones. Sin embargo, es bien sabido que la influencia genética de la población danesa en nuestro *pool* genético es muy baja y podría ser considerada como nula.

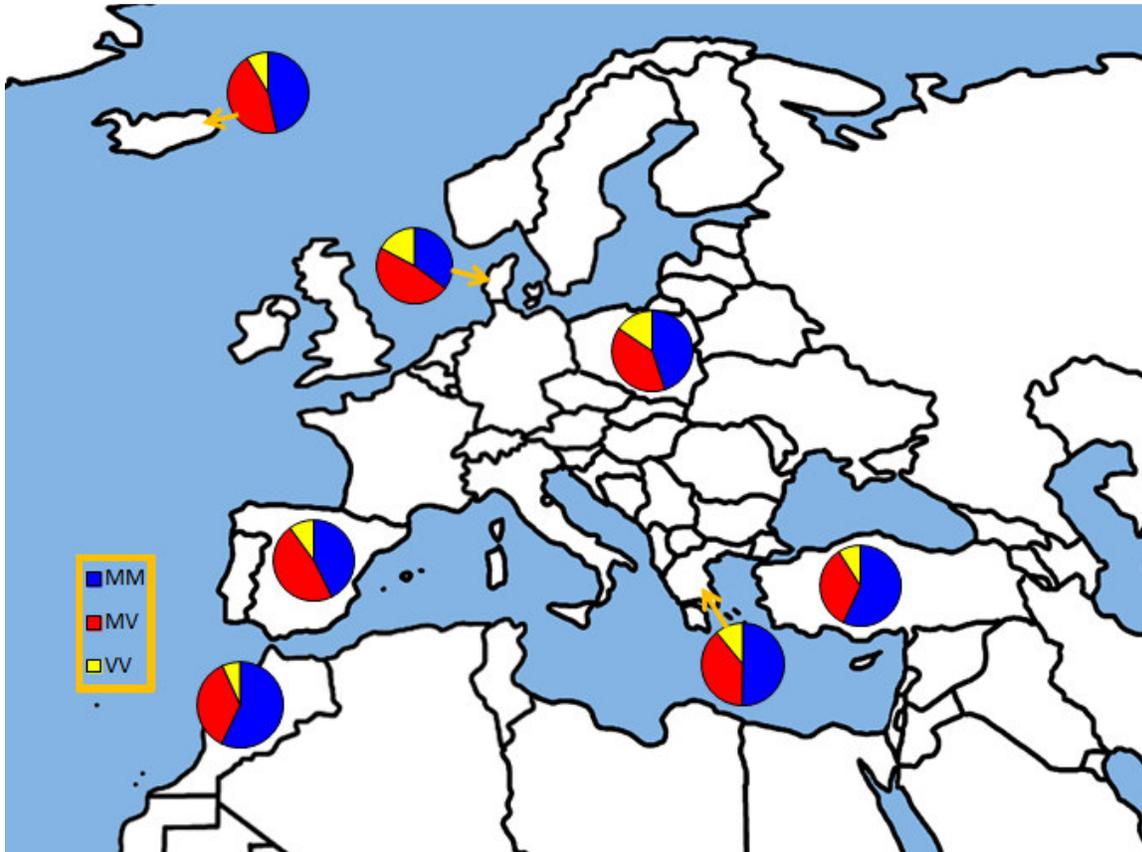
Para poder comprender esa aparente semejanza se revisaron las similitudes génicas y genotípicas por pares de poblaciones con todas las poblaciones que tienen estudios reportados para población sana. Se encontró que poblaciones

como Marruecos y Turquía (Nadifi *et al.*, 2008; Erginel-Unaltuna *et al.*, 2001) presentan similitud a nivel genotípico, lo que podría esperarse debido a su historia y a que corresponden al mismo grupo étnico. Sin embargo, esa generalización no es posible ya que poblaciones europeas que se encuentran geográficamente cercanas no son similares, como es el caso de Polonia y Dinamarca (Bratosiewicz *et al.*, 1999; Dyrbye *et al.*, 2008), o el caso de Grecia y Turquía (Saetta *et al.*, 2006; Erginel-Unaltuna *et al.*, 2001) así como poblaciones relacionadas históricamente como es el caso de Dinamarca e Islandia (Dyrbye *et al.*, 2008; Georgsson *et al.*, 2006). Esto permite concluir que no hay relación directa entre las frecuencias génicas, genéticas y la geografía para este polimorfismo al menos entre las poblaciones comparadas (Tabla 4; Figura 10).

Igualmente, se compararon las frecuencias alélicas de las poblaciones por pares y las poblaciones más parecidas son las de Turquía y Marruecos, y las que menos son las de Grecia y Dinamarca. Al comparar este estudio con los demás se ve que la que más similitud muestra es la de Dinamarca y Marruecos muestra diferencias significativas. De nuevo la población de Corea es la que muestra diferencias significativas con las demás (Tabla 4).

En todos los casos la población coreana es la que muestra ser significativamente diferente (Tabla 5 y Tabla 6). Debido a que no se cuenta con reportes para otras poblaciones del oriente de Asia, no es posible comparar esos datos para verificar si esa falta de relación frecuencia-geografía se mantiene por fuera de las poblaciones caucásicas. Es de resaltar que la única población africana para la que

se han reportado datos para este polimorfismo es la marroquí (Figura 10) y por algunos autores esa zona es considerada racialmente más similar a la caucásica mediterránea que al resto de África (Bosch *et al.*, 2000).



**Figura 10.** Mapa de Europa y el norte de África con las frecuencias genotípicas de los países incluidos en este trabajo marcadas. El color azul corresponde al genotipo MM, rojo al heterocigoto MV y amarillo es el genotipo VV. (Modificado de <http://vectorsya.com/gallery/img65.search.htm>)

Al revisar los estadísticos de los  $F_s$  globales se encuentra que no hay diferencias significativas entre las poblaciones comparadas en este estudio.

Tanto  $F_{IS}$  como  $F_{IT}$  presentan valores positivos y cercanos a cero. Estos valores indican que no hay efectos de endogamia ni posible efecto Wahlund (Wahlund, 1928) al mezclar las poblaciones y analizarlas como un todo.

Con respecto a  $F_{ST}$ , el valor es de 0.16, (Tabla 5), un valor ligeramente mayor al estimado para el genoma humano que es un valor alrededor de 0.125 (Cavalli-Sforza, 1966; Lewontin, 1972). Sin embargo, al evaluar el valor de  $F_{ST}$  para los pares de poblaciones (Tabla 6) vemos que las comparaciones de cualquiera de las poblaciones con la población coreana están mostrando valores de  $F_{ST}$  de hasta diez veces más que los observados en las otras comparaciones (Tabla 6).

Al eliminar la población coreana del análisis global se observan resultados mucho menores (Tabla 7), lo cual ratifica la diferencia entre esa población y las otras poblaciones incluidas en este estudio.

---

$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
0.0158	0.0126	0.0282

---

**Tabla 7.** Estadísticos F globales excluyendo la población coreana. Ninguno de los valores mostró ser estadísticamente significativo.

Al comparar los valores obtenidos para las  $F_s$  globales (Tabla 5 y Tabla 7), los valores de  $F_{IS}$  se reducen a la mitad (de 0.033 a 0.016) y los valores de  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$  se reducen diez veces (de 0.165 a 0.013 y de 0.193 a 0.028, respectivamente), lo que ratifica la enorme diferencia que están introduciendo los datos coreanos a las comparaciones globales y la similitud entre todas las otras poblaciones usadas en estas comparaciones, incluyendo la de este estudio. Tal como se ha reportado por diferentes autores, la homocigosis en este polimorfismo podría ser un factor de riesgo al menos para CJD (Erginel-Unaltuna *et al.*, 2001) y en contraparte la heterocigosis para este polimorfismo puede actuar como un factor de protección tanto para sCJD como para la forma iatrogénica (Palmer *et al.*, 1991; Mead *et al.*, 2003), por lo tanto, la mayoría de la población de estudio tiene el genotipo protector (al analizar sólo el polimorfismo M129V), al menos para iCJD y sCJD.

## 11 Conclusiones

- Los resultados de este trabajo muestran que el genotipo más frecuente del polimorfismo M129V en la población colombiana es el heterocigoto, seguido por el genotipo homocigoto para metionina.

Esto podría constituir una ventaja adaptativa para la población colombiana ya que se ha reportado en la literatura que al genotipo heterocigoto se le atribuye un factor de protección para este tipo de enfermedades

- Se estandarizó la técnica de PCR, al igual que la restricción para este polimorfismo, lo que podría complementar un set de herramientas para el diagnóstico de enfermedades producidas por priones en el país.
- No es posible explicar porque se presenta similitud de frecuencias génicas y genotípicas entre este estudio y el de Dinamarca, pero se puede inferir que la similitud que existe entre España y este estudio se debe a la migración de españoles durante la conquista y colonia de América.
- Los resultados de las comparaciones por pares de poblaciones no muestran resultados contundentes. Por un lado se tiene el caso de poblaciones geográficamente cercanas por ejemplo Turquía y Marruecos y se encontró similitud en frecuencias génicas y genotípicas entre ellas, pero al comparar Polonia y Dinamarca, poblaciones geográficamente cercanas, presentan diferencias significativas lo que lleva a decir que no se puede establecer un gradiente geográfico en relación a la distribución del polimorfismo en las poblaciones analizadas.
- En todos los casos las poblaciones se encontraron en EHW, por lo cual no se detectó ningún tipo de selección sobre alguno de los alelos de este polimorfismo, esto es consecuente con que las manifestaciones de este tipo de enfermedades se presentan después de la edad reproductiva.
- Los valores de las  $F_s$  globales muestran similitudes entre las poblaciones comparadas y la de este estudio excepto por el caso de la población de Corea la cual muestra diferencias significativas con las demás. Debido a la falta de

más reportes del oriente de Asia en este momento no se puede tener seguridad de si se trata de un evento aislado de esos datos particulares o si se constituye en una característica de las poblaciones asiáticas la baja frecuencia del alelo V.

## **12 Recomendaciones**

- Aumentar el tamaño de la muestra e incluir un número representativo de individuos de las diferentes zonas de la geografía nacional.
- Realizar un estudio similar con población antioqueña ya que se sabe que esta población tiene un componente caucásico más alto que el de otras regiones de Colombia y comparar los resultados con los de este estudio.
- Buscar información de este polimorfismo en otras poblaciones mestizas latinoamericanas para saber si el comportamiento de las frecuencias es similar al observado en este estudio piloto.
- Estudiar a la par con el polimorfismo M129V la mutación puntual D178N, analizar su distribución en el país y compararla con reportes mundiales ya que al tener genotipos que impliquen combinaciones específicas de alelos de estas dos variantes del gen, el fenotipo del paciente será diferente. Por lo tanto es de interés el estudio tanto en IFF como en CJD.
- Establecer colaboración con grupos de investigación que cuenten con laboratorios especializados para el procesamiento de muestras de alto riesgo

biológico para realizar un estudio de casos y controles, para así establecer la incidencia de las enfermedades por priones en el país.

### 13 Referencias

1. **Abid, K. Soto, C.** The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci* **2006**; 63: 2342-2351.
2. **Aguzzi A.** Cell biology: Beyond the prion principle. *Nature* **2009**; 459: 924-925.
3. **Bosch E, Calafell F, Pérez-Lezaun A, Clarimón J, Comas D, Mateu E, Martínez-Arias R, Morera B, Brakez Z, Akhayat O, Sefiani A, Hariti G, Cambon-Thomsen A, Bertranpetit J.** Genetic structure of north-west Africa revealed by STR analysis. *Eur J Hum Genet* **2000**; 8: 360-366.
4. **Bratosiewicz J, Kordek R, Kulczycki J, Botts G, Liberski PP.** Molecular analysis of PRNP gene in Polish population and in Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol* **1999**; 37: 277-280.
5. **Brown DR, Clive C, Haswell SJ.** Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem* **2001**; 76: 69-76
6. **Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P.** The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* **1987**; 37: 895-904.
7. **Castellanos A, Pérez Prieto M, Castrodeza J, Mirón Canelo JA, González-Sarmiento R.** M129V PRNP gene polymorphism in Castilla y León shows a similar distribution to other Spanish regions and other European countries. *Med Clin (Barc)* **2010**; 134: 254-256.

8. **Cavalli-Sforza LL.** Population structure and human evolution. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **1966**; 164: 362-379.
9. **Chiesa R, Harris DA.** Fishing for prion protein function. *PLoS Biol* **2009**; 7: e75.
10. **Croes EA, Dermaut B, Houwing-Duistermaat JJ, Van den Broeck M, Cruts M, Breteler MM, Hofman A, van Broeckhoven C, van Duijn CM.** Early cognitive decline is associated with prion protein codon 129 polymorphism. *Ann Neurol* **2003**; 54: 275-276.
11. **Del Bo R, Comi GP, Giorda R, Crimi M, Locatelli F, Martinelli-Boneschi F, Pozzoli U, Castelli E, Bresolin N, Scarlato G.** The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. *J Neurol* **2003**; 250: 688-692.
12. **DeMarcML, Daggett V.** Characterization of cell-surface prion protein relative to its recombinant analogue: insights from molecular dynamics simulations of diglycosylated, membrane-bound human prion protein. *J Neurochem* **2009**; 109: 60-73.
13. **Duque-Velásquez JC, Villegas A, Rodas JD.** Encefalopatía espongiformes transmisibles: Biología del prion y estado actual de la vigilancia epidemiológica en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **2010**; 23: 240-249.

14. **Dyrbye H, Broholm H, Dziegiel MH, Laursen H.** The M129V polymorphism of codon 129 in the prion gene (PRNP) in the Danish population. *Eur J Epidemiol* **2008**; 23: 23-27.
15. **Erginel-Unaltuna N, Peoc'h K, Komurcu E, Acuner TT, Issever H, Laplanche JL.** Distribution of the M129V polymorphism of the prion protein gene in a Turkish population suggests a high risk for Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur J Hum Genet* **2001**; 9: 965-968.
16. **Fisher RA.** The logic of inductive inference (with discussion). *J R Stat Soc* **1935**; 98: 39-82.
17. **Foster J, Hunter N.** Transmissible spongiform encephalopathies: transmission, mechanism of disease, and persistence. *Curr Opin Microbiol* **1998**; 1: 442-447.
18. **Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG.** Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* **2003**; 66: 213-239.
19. **Georgsson G, Tryggvason T, Jonasdottir AD, Gudmundsson S, Thorgeirsdottir S.** Polymorphism of PRNP codons in the normal Icelandic population. *Acta Neurol Scand* **2006**; 113: 419-425.
20. **Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, Leblanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW, Haltia M, Willis PR, Hauw JJ, McKeever PE, Monari L, Schrank B, Swergold GD, Autilio-Gambetti L, Carleton Gajdusek D, Lugaresi E, Gambetti P.** Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* **1992**; 258: 806–808.

21. **Goudet J, Raymond M, de Meeüs T, Rousset F.** Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **1996**; 144: 1933-1940.
22. **Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR.** Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* **2000**; 482: 257-260.
23. **Griffith JS.** Self-replication and scrapie. *Nature* 1967; 215: 1043–1044.
24. **Harris DA.** Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* **2003**; 66: 71–85.
25. **Haywood AM.** 1997. Transmissible Spongiform Encephalopathies. *N Engl J Med* **1997**; 337: 1821-1828
26. **Hill AF, Joiner S, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Poulter M, Wadsworth JD, Collinge J.** Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain* **2006**; 129: 676-85.
27. **Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H, Ironside JW, Collinge J.** Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* **2003**; 126: 1333-1346.
28. **Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O, Yedidia Y, Rouvinski A, Papy-Garcia D, Barritault D, Vlodaysky I, Taraboulos A.** Heparan Sulfate Is a Cellular Receptor for Purified Infectious Prion. *J Biol Chem* **2005**; 280: 17062-17067.

29. **Hunt M.** Microbiology and Immunology. University of South Carolina. 2006.  
<http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/slow-vir.htm>
30. **Jeong BH, Nam JH, Lee YJ, Lee KH, Jang MK, Carp RI, Lee HD, Ju YR, Ahn Jo S, Park KY, Kim YS.** Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in a Korean population. *J Hum Genet* 2004; 49: 319-324.
31. **Jobling MF, Stewart LR, White AR, McLean C, Friedhuber A, Maher F, Beyreuther K, Masters CL, Barrow CJ, Collins SJ, Cappai R.** The hydrophobic core sequence modulates the neurotoxic and secondary structure properties of the prion peptide 106-126. *J Neurochem* 1999; 73: 1557-1565.
32. **Johnson RT, Gibbs CJ Jr.** Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1998; 339: 1994-2004.
33. **Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK, Yee VC.** Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol* 2001; 8: 770-774.
34. **Lewontin RC.** The uses of knowledge. *Science*. 1972; 177: 386.
35. **Li X, Rowland LP, Mitsumoto H, Przedborski S, Bird TD, Schellenberg GD, Peskind E, Johnson N, Siddique T, Mesulam MM, Weintraub S, Mastrianni JA.** Prion protein codon 129 genotype prevalence is altered in primary progressive aphasia. *Ann Neurol* 2005; 58: 858-864.
36. **Mackay GA, Knight RS, Ironside JW.** The molecular epidemiology of variant CJD. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2011 2(3):217-27.

37. **Madore N, Smith KL, Graham CH, Jen A, Brady K, Hall S, Morris R.** Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J* **1999**; 18: 6917–6926.
38. **Manson JC, Tuzi NL.** The murine PrP gene (*Prnp*), and murine and human PrP proteins. Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press, **2001**.
39. **Marijanovic Z, Caputo A, Campana V, Zurzolo C.** Identification of an Intracellular Site of Prion conversion. *PLoS Pathog* **2009**; 5: e1000426.
40. **Martin JB.** Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* **1999**; 340: 1970-1980.
41. **McKinley MP, Meyer RK, Kenaga L, Rahbar F, Cotter R, Serban A, Prusiner SB.** Scrapie prion rod formation *in vitro* requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol* **1991**; 65: 1340-1351.
42. **Mead S, Stumpf MP, Whitfield J, Beck JA, Poulter M, Campbell T, Uphill JB, Goldstein D, Alpers M, Fisher EM, Collinge J.** Balancing selection at the prion protein gene consistent with pre-historic kurulike epidemics. *Science* **2003**; 300: 640-643.
43. **Meggio F, Negro A, Sarno S, Ruzzene M, Bertoli A, Sorgato MC, Pinna LA.** Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. *Biochem J* **2000**; 352: 191–196

44. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **1988**; 16: 1215.
45. **Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E.** Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol* **2003**; 2: 167-176.
46. **Nadifi S, Slassi I, Hachimi KM, Gazzaz B, Bellayou H, Raddaoui K, Laplanche JL.** The normal distribution of PRNP codon 129 polymorphism in the Moroccan population (Arabs and Casablanca residents). *Pathol Biol (Paris)* **2008**; 56: 133-136.
47. **National Prion Disease Pathology Surveillance Center.** 2011. <http://www.cjdsurveillance.com/index.html>
48. **Nurmi MH, Bishop M, Strain L, Brett F, McGuigan C, Hutchison M, Farrell M, Tilvis R, Erkkilä S, Simell O, Knight R, Haltia M.** The normal population distribution of PRNP codon 129 polymorphism. *Acta Neurol Scand* **2003**; 108: 374-378.
49. **Orr HA.** Fitness and its role in evolutionary genetics *Nat Rev Genet* **2009**; 10: 531-539.
50. **Owen F, Poulter M, Collinge J, Crow TJ.** Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians. *Am J Hum Genet* **1990**; 46: 1215-1216.
51. **Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J.** Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **1991**; 352: 340-342.

52. **Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, Hock C, Nitsch RM, de Quervain DJ.** The prion gene is associated with human long-term memory. *Hum Mol Genet* **2005**; 14: 2241-2246.
53. **Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H.** Classification of sporadic Creutzfeldt–Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* **1999**; 46: 224–233.
54. **Pauly PC, Harris DA.** Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **1998**; 273: 33107–33110.
55. **Pedersen NS, Smith E.** Prion diseases: epidemiology in man. *APMIS* **2002**; 110: 14-22.
56. **Prusiner SB.** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **1982**; 216: 136-144.
57. **Prusiner SB.** Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95: 13363–13383.
58. **Prusiner SB.** Shattuck lecture – neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* **2001**; 344: 1516-1526.
59. **Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D.** REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **2010**; 38: D234-D236.
60. **Rousset F, Raymond M.** Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* **1995**; 140: 1413-1419.

61. **Rujescu D, Meisenzahl EM, Giegling I, Kirner A, Leinsinger G, Hegerl U, Hahn K, Möller HJ.** Methionine homozygosity at codon 129 in the prion protein is 684 associated with white matter reduction and enlargement of CSF compartments in 685 healthy volunteers and schizophrenic patients. *Neuroimage* **2002**; 15: 200-206.
62. **Saetta AA, Michalopoulos NV, Malamis G, Papanastasiou PI, Mazmanian N, Karlou M, Kouzoupis A, Korkolopoulou P, Patsouris E.** Analysis of PRNP gene codon 129 polymorphism in the Greek population. *Eur J Epidemiol* **2006**; 21: 211-215.
63. **Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr.** Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* **1993**; 268: 20276-20284.
64. **Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB.** Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93: 14945-14949.
65. **Wahlund S.** Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* **1928**; 11: 65-106
66. **Weir BS, Cockerham CC.** Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* **1984**; 38: 1358-1370.

67. **Will RG.** Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, Kuru. *Br Med Bull* **2003**; 66: 255-265.
68. **Wright S.** Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 2. The Theory of Gene Frequencies. University of Chicago Press, Chicago. **1969**.
69. **Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, von Schroetter C, López García F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K.** NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**; 97: 145-150.