

## ENCEFALOPATÍA DE CREUTZFELDT - JAKOB CON MUTACIÓN E200K A PROPÓSITO DE UN CASO REPORTADO COMO 'ESPORÁDICO'

Rolando M. Cosacov\*, Ana Lia Taratuto \*\*, Graciela Ghiraridi \*\*\*, Pilar Barrionuevo \*,  
Anatilde Diaz \*, Christian Begué \*\*, Horacio Martinetto \*\*

\*Hospital Misericordia. Cba. Argentina. \*\*Centro de Referencia Neuropatológico y de Biología Molecular de Creutzfeldt-Jakob. FLENI. Bs.As. Argentina. \*\*\* Hosp. Córdoba. Cba. Argentina.

### RESUMEN

La encefalopatía de Creutzfeldt Jakob (ECJ), es la de mayor incidencia dentro del grupo de las encefalopatías espongiiformes transmisibles o enfermedades por priones, las que tienen como característica única entre todas las patologías, la de poder presentarse como esporádica, infecciosa/ iatrogénica, o hereditaria.

Se han descripto mas de 20 mutaciones del gen (*PRNP*) que codifica la proteína prion, capaces de generar la ECJ en su forma hereditaria o familiar (fECJ). Se comunica un caso que fue referido como CJ 'esporádico' probable según criterios de la OMS y resultó después del estudio molecular, CJ familiar E200K

**Palabras claves:** Encefalopatía - Creutzfeldt Jakob- E200K familiar.

### ABSTRACT

**Introduction:** Creutzfeldt Jakob disease (CJD) has the highest incidence of the whole group of transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases, which have the unique feature among all pathologies, to be able to appear as infectious/iatrogenic, sporadic or hereditary, being common to all, the deposition of an abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in the central nervous system. More than 20 mutations of the gene (*PRNP*) that encodes the prion protein have been described. We here report a case of CJD(E200K) referred as probable

'sporadic' according to WHO. **Methods:** clinical, pathologic, and molecular features of the disease were characterized using EEG, neuropathology, prion protein (PrP) Western blot and gene (*PRNP*) analysis.

**Results:** The patient developed visual hallucinations, myoclonus, memory loss, tremor, disbasia and generalized convulsives seizures dying six months after onset. On neuropathologic examination, spongiform changes were observed and PrP immunopositivity detected. Western blot analysis showed the presence of proteinaseK (PK)-resistant PrP (PrP<sup>Sc</sup>) with the nonglycosylated isoform of approximately 21 kd. and DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis showed the E200K mutation.

**Discussion:** The PRNP(E200K) mutation is the most frequent cause of the hereditary-familial CJD (fCJD). Clusters of this variety have been described in Chileans, Slovaks from Orava, Jews Israelies of Libyan origin, and Japanese.

There was no available data of affected relatives of the patient which have suggested he was fCJD, but due to his Chilean origin *PRNP* studies were carried out. In fact the clinical and pathology of this familial form, with remarkable exceptions, resembles sporadic cases but has a greater incidence, in these groups than sporadic in the general population.

**Conclusion:** This patient, although clinically reported as probable 'sporadic', after molecular characterization resulted a CJD(E200K) probably belonging to the Chilean cluster.

**key words:** Creutzfeldt Jakob- Disease (CJD), E200K.

## INTRODUCCIÓN

La ECJ es la de mayor incidencia dentro del grupo de las encefalopatías espongiiformes transmisibles o enfermedades por priones las que tienen como característica única entre todas las patologías, la de poder presentarse como infecciosa / iatrogénica, esporádica siendo común a todas, la deposición de una proteína prion anormal (PrP<sup>Sc</sup>) en el sistema nervioso central (1-2).

Se han descrito más de veinte mutaciones del gen *PRNP*, que codifica la proteína prion (3) y aparecen asociadas a distintos fenotipos clínico patológicos como la presentación atáxica en la mutación P102L (4); o el insomnio familiar fatal y disautonomía en la D178N (5), sugiriéndose que la sustitución de cada aminoácido produce distintos cambios conformacionales que originan los distintos fenotipos (6).

La mutación del codon 200 en el gen *PRNP* es la causa más frecuente de la ECJ hereditaria (ECJ -E200K) dando cuenta del 70% de las familias afectadas en el mundo (7). Se han descrito "clusters" de esta variedad (E200K), en chilenos, eslovacos de la región de Orava, judíos israelíes de origen libios, y japoneses (8-11).

En Argentina el 11% de los casos de ECJ poseen mutación en el codon 200 (12).

El codon 129 del gen *PRNP* es polimórfico. Tal polimorfismo no determina patología pero tiene una singular importancia para determinar el fenotipo y la susceptibilidad a contraer la enfermedad sea esta infecciosa, esporádica o heredada, con un riesgo relativo mayor para el genotipo Met/Met (13-15).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Caso clínico:** Seis meses antes de su muerte, un hombre de 74 años, sin antecedentes significativos comenzó con episodios de desorientación témporo-

espaciales, cambio en la conducta, retraimiento, agresividad familiar, mioclonías a ruidos, espontáneas y durante el sueño, alucinaciones visuales, trastornos en la marcha y temblor. En sus últimos 15 días presentó convulsiones generalizada sub intrantes, con pobre respuesta a anticonvulsivos permaneciendo entre sopor y coma y presentando por momentos movimientos de los cuatro miembros sin propósitos. Espontáneamente y ante mínimas estimulaciones motoras o sensitivas, se observaron hipertonía de miembros, tronco o generalizadas que fueron interpretadas según sus variaciones como convulsiones focales, mioclonías, paratonías y oposicionismo. Se observaron fasciculaciones en miembros inferiores. No se constató Babinski y los reflejos osteotendinosos eran ininterpretables por la hipertonía que se producía al intentar obtenerlos.

La muerte sobrevino por complicaciones sistémicas, respiratorias e infecciosas.

Nacido en Chile, emigró a Argentina a los 18 años perdiendo contacto con su familia. Realizó tareas rurales y finalmente carpintería. Tiene tres hijos sanos.

La RMN en T1, T2 y Flair mostró hallazgos inespecíficos como imágenes periventriculares en sustancia blanca del centro oval cápsulo estriadas y sublenticulares bilaterales y dilatación de surcos corticales y vermianos y probables pequeños higromas frontales bilaterales. El L.C.R fue normal al igual que su laboratorio general. El EEG presentó complejos periódicos de ondas agudas y lentas con períodos de supresión eléctrica.

**Autopsia de cerebro:** (autopsia parcial). Se recibieron en el Centro de Referencia fragmentos de corteza cerebral y núcleos de la base fijados, así como un fragmento que incluía corteza frontal congelado para Western Blot.

**Estudio neurológico:** Tacos fijados en formol, postfijación en ácido ósmico, inclusión en parafina, coloración con hematoxilina eosina, Luxol Fast Blue-PAS, Inmunomarcación GFAP, beta amiloide, Tau, Ubiquitina.

**Estudio molecular:** Protocolo de WB PrP. Se prepararon homogenatos de sustancia gris (20% m/v) congelada del paciente y de un caso PrPsc positivo como control. Alícuotas de los homogenatos se trataron con proteasa K (1ug/ul) a 37°C durante una hora mientras que otras se incubaron sin proteasa K en paralelo para observar el *shift* de peso molecular generado por el tratamiento con la proteasa.

Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida (16.5%) con SDS (1%) y glicerol (5%), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpo monoclonal 3F4.

**Caracterización del codón 200 de PRNP :** Se extrajo DNA genómico de cerebro, se amplificó el gen PRNP por PCR utilizando *primers* específicos (secuencia codificante completa). Los fragmentos amplificados se digirieron con la enzima de restricción BsmA1 y fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida 10% que se tiñó con bromuro de etidio. La enzima de restricción BsmA1 reconoce la secuencia 3'-CAGAG-5', que aparece con la mutación.

## RESULTADOS

El estudio neuropatológico mostró extensos cambios espongiiformes en corteza y ganglios de la base con hiperplasia astrogial reactiva. Además se detectaron depósitos escasos de placas de beta amiloide pero no cambios neurofibrilares de Alzheimer, placas seniles ni otra alteración de valor diagnóstico (figuras 3-4-5).

El WB para PrP demostró la presencia de PrP resistente a la PK que presentó el *shift* característico en el peso molecular; la forma no glicosilada mostró un peso molecular de alrededor de 21kDa (figura1).

El análisis del ADN por RFLP mostró mutación del codon 200 (E200K) (figura2) en un alelo y el genotipo del codón 129 fue heterocigota ( Met/Val).

## DISCUSIÓN

A pesar de carecer de datos familiares del paciente, su origen chileno nos llevó a investigar la presencia de la mutación E200K (16).

La penetrancia de la mutación E200K es edad dependiente y se estima casi del 100% a los 80 años (17) existiendo una comunicación de un probable caso chileno a los 88 años (10).

La fECJ (E200K) presenta fenómeno de anticipación pero se desconoce su mecanismo molecular (18).

El paciente era heterocigota para el codon 129(M/V). En portadores de la mutación E200K el codon 129 homocigota para la metionina esta sobrerrepresentado (78.6% de casos vs. heterocigotas 24%) (19) al igual que en todas las variedades de ECJ (20) ya que en la población caucásica general alrededor de 51% son heterocigotas, y 38% y 11% son homocigotas para la Metionina y Valina respectivamente según algunos trabajos con variaciones poblacionales (21).

El paciente presentó fasciculaciones en miembros inferiores. No se realizaron exámenes bio-eléctricos.

Una neuropatía periférica desmielinizante sin Pr Sc en nervios periféricos (22) esta descrita en la ECJ con mutación del codon 200, en la ECJ esporádica (23) y en la variante de la ECJ (24).

La clínica de este paciente coincide con la de otros casos chilenos (25). De hecho la clínica y la patología de esta forma familiar aunque con notables excepciones (26) se asemeja a la esporádica (1, 9, 27) pero tiene una incidencia mayor en estos grupos que el esporádico en la población general.8

El genotipo del codon 129 es solo uno de los factores responsables del fenotipo (28).

A igual mutación y genotipo del codon 129 puede haber remarcables diferencias en el fenotipo aun dentro de una misma familia al menos en algunas ECJ hereditarios y esporádicas (26, 29, 30).

Han sido reportado otros polimorfismos en diversos codones con significación a determinar (31).

En nuestro país se informó recientemente un caso asociado a la mutación E200K, con genotipo 129 (Met/Met) con inesperado fenotipo clínico-patológico de insomnio fatal (32).

**CONCLUSIONES**

Este paciente, aunque clínicamente se presentó como un caso "esporádico" probable, resultó ECJ familiar (E200K) y su cuadro clínico es acorde con la mutación E200K, perteneciente al cluster chileno de la f(ECJ).

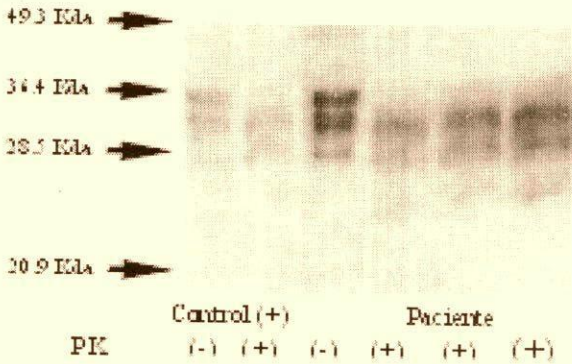


Fig. 1. Western blot de PrP

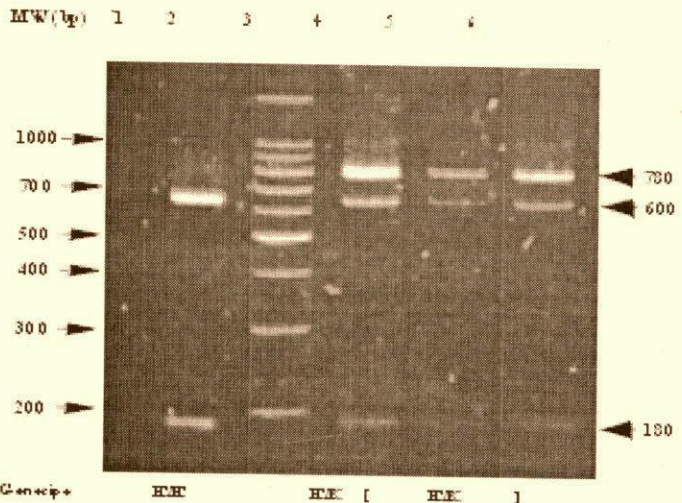


Fig. 2. Caracterización del codón 200 de PRNP. Mutación E200K del gen PRNP. GAG=Glutamato, AAG=Lisina.

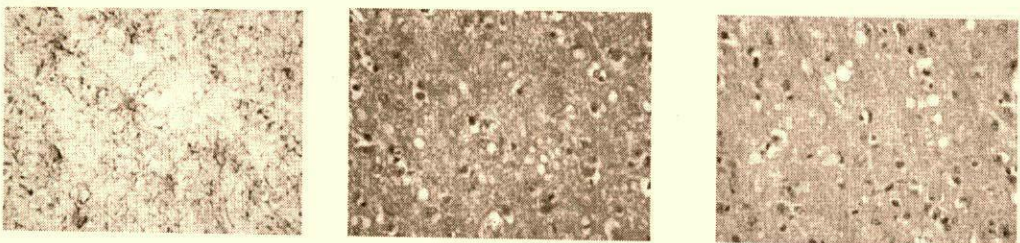


Fig. 3, 4 y 5 Cerebro con tinción GFAP y H. E.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Richard T. Johnson, Clarence J. Gibbs Medical Progress: Creutzfeldt-Jakob Disease and Related Transmissible Spongiform Encephalopathies *The New England Journal of Medicine*. December 31, 1998. Vol. 339, No. 27
2. Prusiner, Stanley B M.D. Shattuck Lecture. Neurodegenerative Diseases And Prions. *N Engl J Med*, 344, 17:1516-1526. 2001.
3. Prusiner Stanley B and Michael R. Genética de priones; *Annu. Rev. Genet.* 1997
4. Prusiner SB, Hsiao KK. Human prion diseases. *Ann Neurol* . 1994; 35: 385-395
5. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* . 1986; 315: 997-1003
6. J. A. Mastrianni, MD PhD; , S. Capellari, MD, G. C. Telling, PhD, D. Han, MS, P. Bosque, MD, S. B. Prusiner, MD and S. J. DeArmond, MD PhD Inherited prion disease caused by the V210I mutation Transmission to transgenic mice. *Neurology* 2001;57:2198-2205- 2001
7. Lee HS, Sambuughin N, Cervenakova L, Chapman J, Pocchiari M, Litvak S, Qi HY, Budka H, del Ser T, Furukawa H, Brown P, Gajdusek DC, Long JC, Korczyn AD, Goldfarb LG Ancestral origins and worldwide distribution of the prnp E200K mutation causing familial CJD. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1063-1070
8. Meiner Z, Gabizon R, Prusiner SB. Familial Creutzfeldt-Jakob disease. Codon 200 prion disease in Libyan Jews. *Medicine (Baltimore)* 1997;76:227-37
9. I Inoue, T Kitamoto, K Doh-ura, H Shii, I Goto and J Tateishi Japanese family with Creutzfeldt-Jakob disease with codon 200 point mutation of the prion protein gene. *Neurology*, Vol 44, Issue 2 299-301, 1994.
10. Salvatore, M.; Pocchiari, M.; Cardone, F.; Petraroli, R.; D'Alessandro, M.; Galvez, S.; Brown, P.; Macchi, G.; Fieschi, C.; Colosimo, C. Codon 200 mutation in a new family of Chilean origin with Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1996.61:111-112
11. Goldfarb LG, Brown P, Mitrova E, et al. Creutzfeldt-Jakob disease associated with the PRNP codon 200 sup Lys mutation: an analysis of 45 families. *Eur J Epidemiol* 1991;7:477-862.
12. Unpublished data from Centro de Referencia Neuropatológico y de Biología Molecular de Creutzfeldt-Jakob. FLENI. Bs.As. Argentina. Comunicación personal.
13. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC, Palmer MS, Collinge J. *Hum Genet* 1996.98:259-64.
14. JL Laplanche, N Delasnerie-Laupretre, JP Brandel, J Chatelain, P Beaudry, A Alperovitch and JM Launay . Molecular genetics of prion diseases in France. French Research Group on Epidemiology of Human Spongiform Encephalopathies *Neurology*, Vol 44, Issue 12 2347-2351, 1994
15. Prusiner S, De Armond Sj. Prions diseases and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:311-9
16. Brown P Galvez S, Goldfarb, LG, et al. Familial Creutzfeldt-Jakob disease in Chile is associated with the codon 200 mutation of the PRNP amyloid precursor gene on chromosome 20. *J Neurol Sci* 1992;112:65-7
17. Chapman J, Ben-Israel J, Goldhammer Y, Korczyn AD The risk of developing Creutzfeldt-Jakob disease in subjects with the PRNP gene codon 200 point mutation. *Neurology* 1994;44:1683-6
18. H. Rosenmann, PhD, E. Kahana, MD, A. D. Korczyn, MSc, MD, I. Kahana, MSc, J. Chapman, MD, PhD and R. Gabizon, PhD . Preliminary evidence for anticipation in genetic E200K Creutzfeldt-Jakob disease *Neurology* 1999;53:1328
19. Mitrova E, Belay G Creutzfeldt-Jakob disease with E200K mutation in Slovakia: characterization and development. *Acta Virol* 2002;46:31-9

20. The EUROCJD Group. Genetic epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe. *Rev Neurol (Paris)* 2001 Jul;157(6-7):633-7
21. S. Zivkovic, M. Boada, O. Lopez. Revision de las enfermedad del Creutzfeldt-Jakob y otras enfermedades priónicas. *Rev. Neurol* 2000;31:1171-1179
22. Antoine JC, Laplanche JL, Mosnier JF, et al. Demyelinating peripheral neuropathy with Creutzfeldt-Jakob disease and mutation at codon 200 of the prion protein gene. *Neurology* 1996;46:1123-1127.
23. Esiri MM, Gordon WI, Collinge J, et al. Peripheral neuropathy in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 1997;48:784
24. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom. *Lancet* 1996;347:921-925
25. Galvez S, Masters C, Gajdusek C. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Chile. *Arch Neurol.* 1980;37:11-4.
26. Chapman J, Brown P, Goldfarb LG, et al. Clinical heterogeneity and unusual presentations of Creutzfeldt-Jakob disease in Jewish patients with the PRNP codon 200 mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993; 56:1109-1112.
27. Kahana E, Zilber N, Abraham M. Do Creutzfeldt-Jakob disease patients of Jewish Libyan origin have unique clinical features? *Neurology*. 1991; 41: 1390-1392.
28. C. Tranchant, MD, L. Geranton, PharmD, C. Guiraud-Chaumeil, MD, M. Mohr, MD and J. M. Warter, MD Basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease *Neurology* 1999;52:1244-1999.
29. M. Yamada, MD, PhD, Y. Itoh, MD, PhD, A. Inaba, MD, Y. Wada, MD, PhD, M. Takashima, MD, S. Satoh, MD, T. Kamata, MD, PhD, R. Okeda, MD, PhD, T. Kayano, DDS, PhD, N. Suematsu, MD, PhD, T. Kitamoto, MD, PhD, E. Otomo, MD, PhD, M. Matsushita, MD, PhD and H. Mizusawa, MD, PhD An inherited prion disease with a PrP P105L mutation Clinicopathologic and PrP heterogeneity *Neurology* 1999; 53:181-1999.
30. Chapman J, Arlazoroff A, Goldfarb LG, et al. Fatal insomnia in a case of familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200 mutation. *Neurology*. 1996; 46: 758-761
31. L. Taratuto, MD PhD, P. Piccardo, MD, E. G. Reich, MD, S. G. Chen, PhD, G. Sevrer, MD PhD, M. Schultz, HT, A. A. Luzzi, MD, M. Rugiero, MD, G. Abecasis, MD, M. Endelman, MD, A. M. Garcia, MD, S. Capellari, MD, Z. Xie, BM, E. Lugaresi, MD, P. Gambetti, MD, S. R. Dlouhy, PhD and B. Ghetti, MD Insomnia associated with thalamic involvement in E200K Creutzfeldt-Jakob disease *Neurology* 2002;58:362-367