

BIODIAGNÓSTICO DE LAS
ENFERMEDADES POR PRIONES
HUMANAS

Raquel Sánchez del Valle Díaz



ALBERT SAIZ HINAREJOS, Doctor en Medicina y Cirugía por la
Universidad de Barcelona,
y

FRANCESC GRAUS RIBAS, Profesor Titular Interino de Medicina de la
Universidad de Barcelona,

CERTIFICAMOS que la memoria titulada “BIODIAGNÓSTICO DE
ENFERMEDADES POR PRIONES HUMANAS”, presentada por
Raquel Sánchez del Valle Díaz, ha estado realizada bajo nuestra dirección
y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser defendida
ante el Tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor en
Medicina y Cirugía.

Dr. Albert Saiz Hinarejos
Barcelona, abril de 2003

Dr. Francesc Graus Ribas

Agradecimientos

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración generosa de numerosas personas, a las que me gustaría expresar mi agradecimiento, en especial:

al Dr. Albert Saiz, por su capacidad científica y docente, dedicación constante, estímulo y paciencia;

al Dr. Francesc Graus, por sus lecciones de ciencia y de método, y por su apoyo;

a todo el personal del Laboratorio de Neurología Experimental, y en particular a Mercè Bonastre y a Eva Caballero;

al Dr. Jordi Yagüe y a Fina Rius, del Servicio de Inmunología;

al Dr. Carlos Nos y al Servicio de Vigilancia Epidemiológica de la Generalitat de Catalunya.

Agradezco, finalmente, su colaboración a todos los neurólogos que han proporcionado la información clínica necesaria para la realización de estos trabajos.

“Los priones representan, en verdad,
el triunfo de la investigación científica sobre el prejuicio”

S. B. Prusiner

A Setono, in memórium

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	7
	I.1. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y otras encefalopatías espongiformes transmisibles humanas	10
	I.2. Diagnóstico de las encefalopatías espongiformes transmisibles en el ser humano	11
	I.3. Proteína 14-3-3 y enfermedades neurológicas.....	12
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
	II.1. Hipótesis	15
	II.2. Objetivos	17
III.	TRABAJOS	18
	1. Utilización y validez de la prueba de la proteína de 14-3-3 en el diagnóstico de enfermedades priónicas: estudio prospectivo de 4 años	19
	2. Isoformas de la proteína 14-3-3 y patrones atípicos en la prueba de la 14-3-3 en el diagnóstico de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	20
	3. Análisis del polimorfismo del exon 1 del gen <i>Tau</i> en las encefalopatías espongiformes transmisibles	21
	4. Características clínicas y genéticas de las enfermedades priónicas en Cataluña (1993-2001)	22
IV.	DISCUSIÓN GENERAL	41
V.	CONCLUSIONES	48

I. INTRODUCCIÓN

La introducción teórica a los trabajos de investigación que componen esta tesis doctoral se presenta en forma de tres artículos de revisión publicados en revistas españolas.

En el primer artículo, *Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y otras encefalopatías espongiformes transmisibles humanas*, se revisan las bases biológicas y las principales características de las enfermedades por priones humanas.

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades por priones son un grupo de enfermedades neurodegenerativas letales que afectan al ser humano y a otros mamíferos. El agente causal de estas enfermedades es el prión, o partícula proteica infectiva, que es una isoforma anómala de una proteína celular normal, la proteína priónica, codificada en el gen *PRNP* situado en el cromosoma 20.

Las EET se pueden presentar como enfermedades de origen genético, transmitidas por una fuente de infección exógena o esporádicas y en el ser humano reciben el nombre de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), enfermedad de Gerstman-Straüsler-Scheinken (GSS), insomnio familiar letal (IFL), nueva variante de ECJ (vECJ) y kuru. La forma más frecuente es la ECJ esporádica, distribuida de forma universal con una incidencia de 1 a 2 casos por millón de habitantes y año. La presencia de una forma homocigota en el polimorfismo metionina-valina situado en el codón 129 del gen de *PRNP* es el único factor que ha demostrado predisponer a la ECJ esporádica; este polimorfismo, además, condiciona la expresión fenotípica de la enfermedad. La ECJ esporádica se presenta típicamente en la 7ª década de la vida como deterioro cognitivo rápidamente progresivo, con demencia, ataxia y mioclonías que progresa de forma irreversible hasta el fallecimiento del enfermo en un periodo de meses.

En el segundo artículo, *Diagnóstico de las encefalopatías espongiformes transmisibles en el ser humano*, se revisan los aspectos diagnósticos de las EET humanas. La Organización Mundial de la Salud, en 1998, estableció, para el diagnóstico de las enfermedades priónicas humanas, las categorías de definitivo, probable y posible. El diagnóstico se confirma en el estudio neuropatológico, cuando este demuestra los típicos cambios de espongiosis, astrocitosis y pérdida neuronal, así como depósito de la proteína priónica patológica; o, en el caso de las formas genéticas, en el análisis genético si este demuestra la presencia de una mutación patogénica en el gen de

PRNP. El diagnóstico de ECJ *in vivo*, con categoría de probable, se realiza cuando a una serie de criterios clínicos se añade la prueba de proteína 14-3-3 positiva o la presencia de complejos periódicos típicos en el EEG en el caso de las formas esporádicas, o se demuestra la presencia del “signo pulvinar” en RM o el depósito de proteína priónica patológica en la biopsia de amígdala palatina en el caso de formas de nueva variante. Además, el diagnóstico de enfermedad priónica exige haber excluido, a través de los estudios que habitualmente se realizan en pacientes neurológicos, otras posibles causas de la clínica. No existe, en el momento actual, ningún método aceptado para el diagnóstico definitivo de las formas esporádicas que proporcione una alternativa al examen neuropatológico convencional; sin embargo, la optimización de técnicas como la electroforesis capilar, que permiten la detección de proteína priónica resistente a proteasas en fluidos biológicos, o la utilización diagnóstica de tejidos no encefálicos como el epitelio olfatorio, podrían ofrecernos esta posibilidad en un futuro no muy lejano.

En el tercer artículo, *Proteína 14-3-3 y enfermedades neurológicas*, se revisa la función biológica de la proteína 14-3-3, su implicación en el diagnóstico o en la patogenia de distintos procesos neurológicos, y las bases de la realización de la prueba de proteína 14-3-3. Con el nombre de proteína 14-3-3 se denomina a una familia de proteínas con diferentes isoformas, ampliamente distribuida en el organismo y especialmente abundante en sistema nervioso central, donde representa un 1% del contenido proteico soluble. En situaciones de destrucción neuronal extensa y rápida se produce una liberación de proteína 14-3-3 al LCR y su detección a través de un método de *immunoblot*, se demostró que se asociaba al diagnóstico de ECJ esporádica. Sin embargo, existen otros procesos en los que la prueba también puede ser positiva, con patrones en el resultado del *immunoblot* iguales o diferentes al típico y que limitan su especificidad diagnóstica. La utilidad de la prueba de proteína 14-3-3 como herramienta pronóstica o diagnóstica en otros procesos diferentes de la ECJ esporádica es todavía discutida.

I.1. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y otras encefalopatías espongiformes transmisibles humanas. Medicina Integral 2001; 37 (7): 308-315

I.2. Diagnóstico de las encefalopatías espongiiformes transmisibles en el ser humano. Medicina Clínica 2002; 119(1):33-37

I.3. Proteína 14-3-3 y enfermedades neurológicas. Cuadernos de esclerosis múltiple 2002; 13: 22-31

Bibliografia (*appendix*)

Jackman R, Schmerr MJ. Analysis of the performance of antibody capture methods using fluorescent peptides with capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Electrophoresis* 2003; 24:892-896

Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, et al. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Eng J Med* 2003;348:711-719

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. 1. HIPÓTESIS

H.1. El reconocimiento por la OMS de la prueba de 14-3-3 como criterio diagnóstico de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) esporádica, así como el interés y la preocupación generada por las enfermedades priónicas tras la aparición de la variante de ECJ, ha provocado un aumento de la difusión de esta prueba en el ámbito médico. La difusión de la prueba de 14-3-3 puede modificar su demanda y su aplicación a una población no seleccionada de pacientes neurológicos su validez para el diagnóstico de ECJ esporádica.

H.2. a. El acúmulo de proteína 14-3-3 en el LCR no sólo se produce en pacientes con ECJ sino también en el de otros pacientes en situaciones de destrucción neuronal rápida e intensa. La utilización en el inmunoblot de anticuerpos específicos contra diferentes isoformas de proteína 14-3-3, podría mejorar la especificidad del resultado y así distinguir entre la ECJ y otras causas de acumulación de esta proteína.

H.2. b. La banda inferior detectada en los inmunoblots de casos atípicos y que corresponde a un peso molecular entre 22 y 30kD, pudiera estar originada por una reacción cruzada del anticuerpo anti-14-3-3 con las cadenas ligeras de inmunoglobulinas libres en LCR y con proteína 14-3-3 propiamente.

H.3. La predisposición a padecer enfermedades priónicas así como la expresión fenotípica de estas en un sujeto determinado podrían estar condicionadas por genes diferentes al de la proteína priónica. En la población caucásica se han descrito dos haplotipos que abarcan toda la región codificante del gen *Tau*, habiéndose demostrado una sobrerrepresentación del haplotipo H1 en grupos de pacientes con diversos procesos

neurodegenerativos. La presencia de un determinado haplotipo del gen *Tau* podría conferir también una mayor predisposición para desarrollar una enfermedad priónica o bien modificar la expresión clínica de estas.

H. 4.a. El polimorfismo metionina-valina del codon 129 del gen de proteína priónica modifica la predisposición de padecer una ECJ esporádica y afecta a la expresión fenotípica de las enfermedades priónicas. El conocer la distribución del polimorfismo en nuestra población normal evitaría el sesgo derivado de utilizar datos de otras poblaciones.

H.4.b. El estudio genético en todo paciente independientemente de la existencia de antecedentes permite identificar a los casos como EET genético o asegurar que se trata de un caso de ECJ esporádico.

H.4.c. La descripción clínica de casos, tanto típicos como atípicos, de enfermedades priónicas en una población facilita la identificación de nuevos enfermos, la detección de sesgos diagnósticos y permite su comparación con otras poblaciones. No es esperable detectar diferencias significativas entre la población de EET catalana y otras poblaciones europeas.

III. 2. OBJETIVOS

O1. Estudiar la evolución de la demanda y la validez de la prueba de proteína 14-3-3 durante el periodo 1997-2000 en España

O2. Mejorar la sensibilidad y especificidad de la prueba de la proteína 14-3-3 para el diagnóstico de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y analizar los patrones atípicos en el resultado de la prueba

O3. Analizar el polimorfismo del exon 1 del gen *Tau* en enfermedades por priones y determinar si este modifica la predisposición a padecer enfermedades priónicas o la expresión clínica de estas

O4. Caracterizar clínica y genéticamente las enfermedades por priones humanas en Cataluña en el periodo 1993-2001

III. TRABAJOS

Trabajo 1: Utilización y validez de la prueba de la proteína de 14-3-3
en el diagnóstico de enfermedades priónicas: estudio prospectivo de 4 años.

Medicina Clínica 2003 (*en prensa*)

Trabajo 2: Isoformas de la proteína 14-3-3 y patrones atípicos en la prueba de la 14-3-3
en el diagnóstico de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

Neuroscience Letters 2002; 320: 69-72

Trabajo 3: Análisis del polimorfismo del exon 1 del gen *Tau* en las encefalopatías espongiformes transmisibles. *Journal of Neurology* 2002; 249: 938-939

Trabajo 4: Características clínicas y genéticas de las enfermedades priónicas humanas en Cataluña (1993-2001). *(pendiente de aceptación)*

CLINICAL AND GENETIC FEATURES OF HUMAN PRION DISEASES IN CATALONIA: 1993-2001

Raquel Sanchez-Valle^{1,3}; Carlos Nos^{4,5}; Jordi Yagüe^{2,3}; Francesc Graus^{1,3}; Angela Domínguez⁴; Albert Saiz^{1,3} for the Catalan Collaborative Study Group for CJD*

¹Services of Neurology , and ²Inmunology , ³Unidad de Bodiagnóstico de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, University of Barcelona, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain

⁴General Directorate of Public Health, Departament of Health and Social Security, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

⁵Unidad de Neuroinmunología Clínica, Hospital Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain

*Other members of the study group are listed in the Appendix

Corresponding author: Albert Saiz, Service of Neurology, Unidad de Bodiagnóstico de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona 08036, Spain. Phone: +34-932275414; Fax:+34-932275783; e-mail: asaiz@clinic.ub.es

Key words: prion, Creutzfeldt-Jakob disease, dementia, genetic, surveillance system, 14-3-3 assay, electroencephalography, epidemiologic studies.

Acknowledgments: The authors thank all physicians and neuropathologists in Catalonia notifying suspect cases to the Catalan surveillance system, and providing data and samples. Supported in part by grant MCyT EET 2001-2216, Madrid, and Generalitat de Catalunya, Spain.

Abstract

We describe the clinical and genetic characteristics of the 72 definite or probable human prion diseases cases died between January 1993 and December 2001 in Catalonia (an autonomous community of Spain, 6 million population). Sixty-three (87%) cases were sporadic Creutzfeld-Jakob diseases (sCJD) (41 definite, 22 probable), with a median age at onset of 66 years. The clinical presentation was dementia in 23 cases, ataxia in 12 and visual symptoms in 4. The median survival was 3 months. The 14-3-3 assay was positive in 96% cases, 60% presented periodic sharp wave complexes (PSWC) in EEG but only 16% the typical signs on MRI. Forty sCJD were studied for codon 129 *PRNP* polymorphism: 70% were methionine/methionine (M/M), 15% valine/valine (V/V) and 15% M/V. Five out of 6 V/V cases did not present PWSC and in two survival was longer than 20 months. Eight cases (11%) were genetic: 3 familial fatal insomnia and 5 familial CJD (fCJD). Three fCJD lacked family history of disease, two presented seizures early at onset and one neurosensorial deafness. The only iatrogenic case was related to a dura mater graft. No case of variant CJD was registered.

The study confirms in our population the consistent pattern reported worldwide on human prion diseases. Atypical features were seen more frequently in sporadic 129 V/V CJD and fCJD cases.

Introduction

Human prion diseases may be sporadic, infectious or inherited (Prusiner, 1998). The possibility of person-to-person transmission of the agent, the not-yet well clarified pathogenesis, and the recent appearance of the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease linked to the bovine spongiform encephalopathy (BSE), reinforce the importance of epidemiological studies in prion diseases. Presently, the definite diagnosis of human prion diseases requires neuropathological confirmation (Kretzschmar *et al.*, 1996). After the WHO consultation in 1998, new diagnostic criteria of human prion diseases were established (WHO, 1998). For the diagnosis of clinically probable sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) the criteria included the 14-3-3 assay (Hsich *et al.*, 1996) with the same diagnostic value as the typical EEG (WHO, 1998). The inclusion of this test has increased the sensitivity of the clinical diagnosis (Zerr *et al.*, 2000a), and its introduction in the surveillance systems has improved the case ascertainment (Saiz *et al.*, 2001).

Promising results of the MRI have been reported (Schroter *et al.*, 2000), mainly in retrospective studies, but its impact for the diagnosis on clinical grounds is not well known yet.

The end point for a surveillance system is to register and to characterise all the cases of the community and achieve the highest rate of definite diagnosis, to be able to detect any epidemiological characteristic of the disease which might be related to new sources of ineffectiveness or susceptibility factors (Masters *et al.*, 1979; Plaitakis *et al.*, 2001). Systematic epidemiological studies recommend genetic analysis of the prion protein gene (*PRNP*) in suspected human prion disease cases (Windl *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1986). The study of the *PRNP* comprises the characterization of the polymorphism of *PRNP* at codon 129 and the screening of mutations.

Catalonia is an autonomous community in north-eastern Spain (6 million population). In August 1997, a Catalan-based surveillance system was set up. Previously, a National Spanish register for CJD was initiated in 1995 recording the cases voluntarily notified by physicians to public health authorities since 1993. Since March 2001, the declaration of the cases to the surveillance system in Catalonia was made mandatory for the referring doctors.

The aim of the study is to describe the characteristics of human prion diseases in our population and to compare them with those reported in other series.

Patients and Methods

Patients

The Catalan surveillance system was initiated in August 1997 working in collaboration with a single reference laboratory for prion diseases diagnosis. All neurologists were encouraged to declare their suspected cases, and to send CSF samples to this reference laboratory for the 14-3-3 assay. In the same way, the surveillance system was informed of all the CSF sent for the 14-3-3 assay and of the result of the assay. Suspected cases were followed by a neurologist from the surveillance system when possible. The hospital records from the cases notified before of the institution of the Catalan surveillance system were retrospectively reviewed. Cases were classified as definite, probable or possible human prion diseases following WHO consultation criteria (WHO, 1998). For this study, we included only definite or probable prion diseases dead before January 2002, followed by the Catalan surveillance system since August 1997 and retrospectively those cases from Catalonia referred to the Spanish register since January 1993.

The clinical and neuroimaging features, when available, were registered as reported by the referring neurologist. The 14-3-3 assay was performed as previously described (Saiz *et al*, 1999). EEG was considered typical if periodic sharp waves complexes (PSWC) were present following the criteria of Steinhoff (Steinhoff *et al*, 1996) .

IV. Genetic studies

V. Samples

DNA was extracted from patients whole blood with QIAamp®DNA Blood Mini Kit Qiagen GmbH, according to the manufacturer procedure. In five cases, whose whole blood samples were not available, DNA was extracted from serum, CSF or paraffin-embedded tissue sections using the QIAamp®DNA Mini Kit Qiagen GmbH.

PRNP sequencing

***PRNP* open reading frame was amplified by PCR of genomic DNA extracted from whole peripheral blood. PCR primers were located at the 5' intron (sense) ECJ-F: 5' ACTCATTTCATTATGCAGGAAACATT and at the 3' intron (anti-sense) ECJ-R: 5' CTAAAAGGGCTGCAGGTGGATAC. PCR amplification was carried out in a 50µl standard reaction mixture on a Perkin Elmer PCR System 2400 Thermal Cycler, with the following cycle**

parameters: preheat at 94°C for 5 min (hot start), 94°C for 1 minute, 53°C for 1 minute, 72°C for 1 min (35 cycles) and a final extension at 72°C for 10 minutes. Products were purified using spin columns Qiaquick, Qiagen GmbH, according to the manufacturer procedure, and sequenced using the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit, and analysed in 377 DNA sequencer (Applied Biosystem).

The four sequencing primers used were:

PrP I 5' TCATTATGCAGGAAACATTTAGTAA (sense)

PrP L 5' CCTGGAGGCAACCGCTACCCA (sense)

PrP M 5' GTGCACAAAGTTGTTCTGGTTGCT (antisense)

Prp I 5' CGTGAAAACATGCACCG (sense).

***PRNP* 51-91 region deletions and insertions.**

Verification of deletions or insertions at the 51-91 region was performed by PCR with exonic primers that amplify a small product that included the complete *PRNP* octapeptide repeat region.

Primers PrP del-F 5' GACCTGGGCTCTGCAAGAAGCGC (sense) and PrP del-R 5'

GGCACTTCCCAGCATGTAGCCG (antisense) give a wild-type allele with a product size of 348

base pairs. When a deletion or insertion was detected, each isolated allele was sequenced. The

PRNP open reading frame was amplified by PCR of genomic DNA extracted from whole peripheral blood using the primers ECJ-F and ECJ-R described above. The PCR product was cloned with TA cloning system, Invitrogen, UK, and clones containing the deleted allele or the wild type allele were isolated. Sequence of each cloned was performed as described above.

Informed consent was obtained for the genetic analysis and the study was approved by the Ethical Committee of Hospital Clínic, Barcelona.

Results

Seventy-two patients with the diagnosis of definite or probable prion disease were recorded from January 1993 to December 2001. Sixty-three cases (87.5%) were sCJD, 8 cases (11%) were genetical prion diseases and only one case was iatrogenic CJD. The overall annual mortality rate was 1.3 cases per million and 1.2 for sCJD.

Genetic features

Forty-seven (65%) of the 72 patients could be genetically studied. Seven patients (4 familial, and 3 apparently sporadic cases) were found to have a *PRNP* mutation. The glutamic acid-to-lysine change at codon 200 (E200K) was detected in 4 cases (2 of them without recognised family history of human prion diseases). Another patient without family history presented a insertion of two R2 octapeptide repeats (familial genetic study is not available). These 5 patients were then classified as familial CJD (fCJD) (Rossi *et al*, 2000).

In 2 cases we found the aspartic acid-to-asparagine change at codon 178 (D178N). One case carried the mutation coupled with methionine at codon 129 in the same allele (D178N-129M, genotype of fatal familial insomnia (Medori *et al*, 1992) and a R3-R4 deletion in the other allele, also coupled with methionine in codon 129. The other case was M/V with a clinical phenotype of fatal familial insomnia (FFI). A third case was also diagnosed of FFI because of the typical clinical and pathologic feature with familial history of disease and proven D178N-129M mutation. Thus, the final number of patients classified as genetic cases was 8 (11%).

Among the other 40 patients without an identified mutation (sCJD), 28 (70%) were homozygous for methionine (M/M) in codon 129, 6 (15%) for valine (V/V) and 6 (15 %) were heterozygous M/V. The distribution of codon 129 genotypes in sCJD were significantly different ($p < 0.01$) from that previously reported in our control population (Saiz *et al*, 2001), but similar to that reported in other caucasian populations (Table 1) (Alperovich *et al*, 1999; Brown *et al*, 1986; Will *et al*, 1998; Windl *et al*, 1996; Windl *et al*, 1999). The distribution of the frequencies of the different genotypes and the age at onset according to the codon 129 is shown in the table (Table 2). We only found three (5%) young cases (49 years or less): one case was M/M, and one V/V. The third case was not studied for polymorphism of codon 129.

Clinical features of sporadic CJD cases

There were 63 cases of sCJD, 37 women (59%) and 26 men (41%). The median age at diagnosis was 66 years (range 44 to 85 years). Forty-one cases (65%) were studied and confirmed pathologically. The clinical classification of these cases was: 34 (83%) “probable” CJD; 4 (10%) “possible” CJD; and 3 (7%) cases did not fulfil criteria of CJD.

The main clinical syndrome at disease onset was dementia in 23 patients, ataxia in 12, and visual disturbances in 4. The rest already presented multifocal deficits or were not described at presentation. During the clinical course, all the patients developed dementia, 56 (89%) myoclonus,

38 (60%) ataxia, 33 (52%) visual symptoms, 31 (49%) extrapyramidal signs and 24 (38%) died in an akinetic mutism state. The pyramidal signs were the less frequent neurological abnormalities (20 patients, 31%). The median survival was 3 months (range 1 to 24 months); only 4 (6%) cases lived more than 20 months after the first symptoms appeared.

In all cases, routine investigations did not suggest an alternative diagnosis. In forty-nine of 51 (96%) cases tested, the 14-3-3 assay was positive (32 definite and 17 probable sCJD), and PSWC were present in the EEG in 37 (26 definite, and 11 probable sCJD) of 62 cases (60%) (Table 3). Twenty-one of the 33 (64%) definite CJD cases who underwent the 14-3-3 assay and EEG, presented both proves positive (including the 3 cases who did not fulfil criteria of CJD); 11 (33%) presented only a positive 14-3-3 assay; and only one presented PSWC but a negative 14-3-3 assay. Among the probable sCJD cases, six out of 17 (35%) presented a positive 14-3-3 assay and a typical EEG; 10 (59%) presented only a positive 14-3-3 assay; and 1 (6%) a typical EEG and negative 14-3-3 assay. The 14-3-3 assay was not performed in 8 definite and 4 probable sCJD cases, and the EEG in 1 probable case. Thus, 11 of 22 probable sCJD cases were registered because of the introduction of a positive 14-3-3 assay as criteria for probable sCJD in 1998.

MRI, available in 50 (79%) patients, was informed as normal or with non-specific changes in 42. Only 8 patients (16%) presented the typical high signals in the basal ganglia on T2- and proton-density-weighted images.

When we analysed the main clinical features and the results of the diagnostic techniques of the cases taking into account their polymorphism in codon 129 we found that the 6 VV cases differed from other in some aspects: PSWC were absent in 5 patients (sensitivity of the EEG 17%) (Table 3) and the duration of the disease was longer than 20 months in two cases. Nevertheless, the median age of onset (65.5 years, range 49 to 78 years) did not differ from that presented in other genotypes. The only case with negative 14-3-3 assay and available genetic study was heterozygous M/V (Table 3).

The only iatrogenic case, a 40-years-old woman that had received a dura mater graft, was registered in 1993. The EEG showed the typical PSWC. The 14-3-3 assay and the characterisation of *PRNP* were not performed.

Clinical features of genetic cases

Eight of the 72 (11%) cases were finally classified as genetic prion diseases: 5 fCJD (4 patients with E200K mutation and one with a two R2 octapeptide insert in the repeat region of *PRNP*), and 3 FFI.

Three of the 4 cases with E200K were men, the median age of onset was 61 years (range 43 to 84 years) and the median survival was 3 months (range 2 to 10 months). All of them presented gait disturbance at onset, with visual symptoms in one, and deafness and limb dysesthesia in other case. In the latter, the electromyography showed a mixed axonal neuropathy, and the audiogram a sensorineuronal loss without other known causes that could explain these findings. Two patients presented seizures very early in the course of the disease; both of them lacked family history of CJD. The first case was a 67-years -old, right handed man who was carried into hospital in January 1999 because of a generalised seizure. He had complained of unsteadiness for a few days before admission. On first examination, he was partially disorientated, with short term memory loss and presented a slight unsteady gait. On the second hospital day he suffered a second generalised tonicoclonic seizure. Since that moment, he presented a fluctuating level of awareness with intermittent episodes of deviation of the head and eyes. It became impossible to maintain an accurate contact with him. Several EEGs showed right periodic lateralized epileptiform discharges (PLEDS) and slowed background. In spite of different antiepileptic treatments his mental status deteriorate, he became into akinetic mutism with severe rigidity and he died 50 days after the clinical onset. His only son carried the mutation, and is currently asymptomatic. The second case with seizures, was a 57 years-old admitted in hospital because visual disturbances. The clinical examination showed left hemianopsia and unstable gait. Mental status examination was normal. Two weeks later, the patient presented fluctuating periods of acute behavioral changes with agitation, visual hallucinations and myoclonus. An EEG showed PLEDS in right occipital areas and slowed background rhythm. Antiepileptic treatment did not improve the clinical or the EEG pattern. He died two months after the clinical onset.

The patient who carried a R2-R2 octapeptide insertion, was a 61years-old man that presented clinically as typical sCJD, without family history of disease. He developed rapidly progressive dementia, myoclonus, ataxia and visual symptoms and he died within 3 moths. Necropsy confirmed CJD diagnosis.

Four out of 5 fCJD cases fulfilled criteria of probable CJD in the course of the disease (14-3-3 assay was positive in 4 cases and PSWC in 3).

A diagnosis of FFI was established in three cases. Two of the 3 cases were men, the onset of disease was at 68, 46, and 38 years. The mean survival was 5,3 months. The first, heterozygous M/V, presented clinically with an extrapyramidal syndrome, in the course of the disease he developed dementia, myoclonus and ataxia. The second, homozygous M/M, was a woman who presented amenorrhea, depression and later developed ataxia and myoclonus. She had family history of the disease with the presence of D178N-129M mutation genotype. The last case, also homozygous M/M, presented an extrapyramidal syndrome, hypersomnolence and cognitive features. The 14-3-3 assay was performed in two cases and both were negative, as well as the EEG which did not show PSWC. A necropsy was performed in two cases and confirmed the selective degeneration of thalamus (Medori *et al*, 1992).

Discussion

We report the clinical and genetic features of 72 patients with definite or probable prion diseases identified in Catalonia from January 1993 to December 2001. Sporadic CJD occurs worldwide in a consistent pattern of disease frequency and distribution, with a relatively stereotyped and characteristic features (Windl *et al*, 1996). Our study provides information supporting this notion. The slight predominance of females (ratio 0.7) has been seen in other studies although the majority indicate that males and females are equally affected (Will *et al.*, 1999). Age-specific incidence rates were as expected with an increase up to middle age and the highest incidence mortality rates in the group 60-to-69 years. Only three cases were 49 years or younger, confirming that sCJD is rare in young adults (Alperovitch *et al.*, 1999). The most common initial symptoms and signs were cognitive impairment and ataxia, with a rapid evolution of deficits involving multiple cerebral areas and a median survival of 3 months. Sixty-five per cent of the cases were pathologically confirmed, however, there were no differences in the main clinical or epidemiological features among definite and probable cases, nor those registered before and after the new epidemiological surveillance system implementation.

The distribution of the polymorphism at codon 129 in our sCJD cases was significantly different from the normal controls, with an overrepresentation of M/M genotype, but it is consistent with previous data from other caucasian populations (Alperovich *et al.*, 1999). We found no differences

in the median age of onset among patients with regard to codon 129 genotype. The homozygous V/V group (8.3%), however, differed from other genotypes because of the much lower presence of PSWC in the EEG and a tendency to a longer survival (Zerr *et al.*, 2000b).

This prospective study confirmed the higher sensitivity of the 14-3-3 assay (96%) in our population compared to the presence of PSWC in EEG (60%) in the clinical diagnosis of sCJD (Zerr *et al.*, 2000a). In only two cases, the 14-3-3 assay was negative. One of them was heterozygous at codon 129, a feature that is associated with a low positivity of the 14-3-3 assay when coupled with a type 2 pathological isoform of prion protein (Zerr *et al.*, 2000a). Nevertheless, our study confirmed that the 14-3-3 assay is particularly useful in V/V homozygous cases.

In a previous work (Saiz *et al.*, 2001), we reported a quasi three-fold increase in the incidence and mortality rates for sCJD after two years of change of a new prospective surveillance system that incorporated the 14-3-3 assay. The probable sCJD cases of that study, however, were not diagnosed according to the new criteria that include the 14-3-3 assay. In the current study, the estimated sCJD mortality would have increased taking into account that a 17.5% of cases were registered as probable sCJD based on new criteria.

The low rate of typical MRI in our patients (16%) contrasts with the data published in other series (sensitivity of 67% for sCJD) (Collie *et al.*, 2001). This finding is not surprising if we consider that MRI is usually requested in the initial diagnostic workup to exclude other conditions. At this initial stage, MRI may be normal or shows subtle signs (Uemura *et al.*, 2002) considered of equivocal diagnostic significance in routine clinical radiological practice (Collie *et al.*, 2001). In this setting, the neurologists may not request follow-up MRI, if the patient develop the full-blown clinical syndrome or the other diagnostic techniques are positive. In vCJD, MRI was also initially reported to be unremarkable in most cases, but after systematic retrospective study the “pulvinar sign” was confirmed in the 79% of the vCJD cases (Collie *et al.*, 2001).

Familial CJD is the most frequent genetic human prion disease in our population, 5 of the 8 genetic cases identified in this study. All but one presented a E200K mutation, and 3 of them lacked family history of prion diseases. Such observation agrees with previous studies indicating that about one-third of cases of “genetic” CJD may not have a family history of the condition (Brown *et al.*, 1986; Windl *et al.*, 1996). The high rate of unknown family history, and the absence of reliable clinical or paraclinical features that may differentiate sporadic and genetic cases emphasize the idea that, in

the setting of a surveillance programme, *PRNP* sequencing should be performed to all suspected cases of prion diseases.

However, unusual features for sCJD: seizures, axonal neuropathy, and neurosensorial deafness were observed in genetic cases, as previously described in E200K cases (Cataldi *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 1993). Thus, seizures were only recorded in two patients with the E200K mutation. In these cases, without family history, the presence of PLEDS in the EEG (Au *et al.*, 1980), and the unresponsiveness to treatment coupled with a positive 14-3-3 assay, lead us to consider the diagnosis of CJD. The rapid evolution of the disease until death in two months suggest that the epileptic features may reflect the severe acute neuronal damage occurring in these patients. Our patients emphasize that these features should be considered as unusual presentation of fCJD. In conclusion, our study describes the etiological subtypes distribution and the clinical and genetic features of the prion disease population in Catalonia. The overall similarity to that reported in other series, confirms in our population the idea that prion diseases present in a consistent pattern in Caucasian populations. Atypical features were seen more frequently in sporadic 129 V/V CJD and fCJD cases. There is no indication of any vCJD cases in Catalonia.

References

- Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta (1999) Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 353: 1673-1674. Data corrected in *Lancet* 2000;355:72.
- Au WJ, Gabor AJ, Vijayan N, Markand ON (1980) Periodic lateralized epileptiform complexes (PLEDs) in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 30:611-617.
- Brown P, Cathala F, Castaigne P, Gajdusek DC (1986) Creutzfeldt-Jakob disease: clinical analysis of a consecutive series of 230 neuropathologically verified cases. *Annals of Neurology* 20:597-602.
- Cataldi ML, Restivo O, Reggio E, Restivo DA, Reggio A (2000) Deafness: an unusual onset of genetic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurological Sciences* 21:53-55.
- Chapman J, Brown P, Goldfarb LG, Arlazoroff A, Gajdusek DC (1993) Clinical heterogeneity and unusual presentations of Creutzfeldt-Jakob disease in Jewish patients with the *PRNP* codon 200 mutation. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 56:1109-1112.
- Collie DA, Sellar RJ, Zeidler M, Colchester ACF, Knight R, Will RG (2001) MRI of Creutzfeldt-Jakob disease: imaging features and recommended MRI protocol. *Clinical Radiology* 56 (9): 726-39.
- Hsich G, Lenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG (1996) The 14-3-3- brain protein in the cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *New England Journal of Medicine* 335:924-930.
- Kretschmar HA, Ironside JW, DeArmond SJ, Tateishi J (1996) Criteria for Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Archives of Neurology* 53: 913-920.
- Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY *et al* (1992) Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *New England Journal of Medicine* 326:444-449.
- Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CS, Bernoulli C, Asker DM (1979) Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Annals of Neurology* 5:177-188.

- Plaitakis A, Viskadouraki AK., Tzagournissakis M, Zaganas I, Verghese-Nikolakaki S, Karagiorgis V *et al.* (2001) Increased incidence of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease on the island of Crete associated with a high rate of PRNP 129-Methionine homozygosity in the local population. *Annals of Neurology* 50 (2):227-33.
- Prusiner SB (1998) The prion diseases. *Brain Pathology* 8 (3): 499-513.
- Rossi G, Giaccone G, Giampaolo L, Iussich S, Puoti G, Frigo M *et al* (2000) Creutzfeldt-Jakob disease with a novel four extra-repeat insertional mutation in the PrP gene. *Neurology* 55:405-410.
- Saiz A, Graus F, Dalmau J, Pifarré A, Marín C, Tolosa E (1999) Detection of 14-3-3 brain protein in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Annals of Neurology* 46 (5) :774-7.
- Saiz A, Nos C, Yagüe J, Dominguez A, Graus F, Muñoz P (2001) The impact of the introduction of the 14-3-3 assay in the surveillance of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in Catalonia. *Journal of Neurology* 248:592-594.
- Schroter A, Zerr I, Henkel K, Tsachampa HJ, Finkenstaedt M, Poser S (2000) Magnetic resonance imaging in the clinical diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Archives of Neurology* 57(12):1751-7.
- Steinhoff BJ, Racker S, Herrendorf G, Poser S, Grosche S, Zerr I *et al* (1996) Accuracy and reliability of Periodic Sharp Wave Complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Archives of Neurology* 53:162-165.
- Uemura A, O'uchi T, Sakamoto T, Yashiro N (2002) High signal of the striatum in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: sequential change on T2-weighted MRI. *Neuroradiology* 44:314-318.
- World Health Organization (1998) Human transmissible spongiform encephalopathies. *Weekly Epidemiology Records* 73:361-72
- Will RG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Mitrova E *et al* (1998) Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six european countries, 1993-1995. *Annals of Neurology* 43:763-767
- Will RG, Alpers MP, Dormont D, Schonberger LD, Tateishi J (1999) Infections and sporadic prion diseases. In: Prusiner SB (ed) *Prion biology and diseases*. New York: Cold Spring Harbor. pp 465-507.

Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T *et al.* (1996) Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the *PRNP* gene. *Human Genetics* 98:259-264.

Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S *et al.* (1999) Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Human Genetics* 98:259-264.

Zerr I, Pocchiari M, Collins S, Brandel JP, de Pedro Cuesta J, Knight RSG, *et al.* (2000) Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 55:811-815.

Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, Bodemer M, Schöter A, Henkel K, *et al.* (2000) Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants. *Annals of Neurology* 48(3):323-9.

Table 1. Codon 129 *PRNP* genotype in sporadic (definite and probable) Creutzfeldt-Jakob disease and normal controls

	M/M	M/V	V/V
Catalonia			
Normal population	43%	42%	15%
n=224	70%	15%	15%
Sporadic CJD n=40			
European data*			
Normal population	39%	50%	11%
n=398	68%	15%	18%
Sporadic CJC n=407			

*Obtained from [1]

Table 2. Age of onset and polymorphism of codon 129 in sporadic CJD.

	M/M	M/V	V/V	total sCJD
N*= 40	n=28 (70%)	n=6 (15%)	n=6 (15%)	n=63
≤49	1	0	1	3
50-59	8	0	1	15
60-69	18	2	2	30
70-79	6	2	2	10
≥80	1	2	0	5

***sCJD cases studied for codon 129 polymorphism**

Table 3. Diagnostic techniques in sporadic CJD

N=63	Positive/Tested (%)	M/M (28)	MV(6)	VV(6)
PSWC in the EEG	37/62 (60%)	20/28 (71%)	3/6 (50%)	1/6 (17%)
14-3-3 assay	49/51 (96%)	28/28 (100%)	5/6 (83%)	6/6 (100%)

PSWC= periodic sharp waves complexes

Appendix Other Members of the Catalan Collaborative Study Group for CJD:

M. Aguilar, G. González, Mutua de Terrassa; J. Aragonés, H. General de Vic; A. Ariza, D. Escudero, H. German Trías i Pujol; R. Blesa, T. Ribalta, J. Santamaría, E. Tolosa, H. Clínic; L. Brieva, H. Arnau de Vilanova; A. Cano, P. Sanz, H. de Mataró; I. Ferrer, R. Reñé, Ciutat Sanitaria Universitaria de Bellvitge; E. Muñoz, H. Verge de la Cinta; A. Ortega, J. Río, R. Rovira, M. Tintoré, H. Vall d'Hebrón; A. Pou, H.del Mar; M. Pujol, H Santa María; M.J.Rey, Banc de Teixits Neurològics; A. Salvadó, H. Creu Roja; J. Sanahuja, H. Sant Pau; J. Serena, H. Josep Trueta; J. Viñas, Parc Taulí

IV. DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades por priones o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son enfermedades neurodegenerativas letales de baja incidencia y distribución universal. La forma clínico-patológica más frecuente de enfermedad por priones humana es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), que se puede presentar como enfermedad esporádica, hereditaria o yatrogénica. Hsich et al, en 1996, publicaron que una técnica de inmunoblot capaz de detectar en LCR una proteína celular normal con siete isoformas, la proteína 14-3-3, se asociaba de forma sensible y específica al diagnóstico de ECJ esporádica. Estudios prospectivos posteriores confirmaron la utilidad diagnóstica *in vivo* de esta técnica por lo que, en 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incluyó como criterio diagnóstico de ECJ esporádica. A lo largo del año 1997 se instauró y validó la técnica de la prueba de proteína 14-3-3 en el laboratorio de Neurología del Hospital Clínic, siendo éste actualmente uno de los dos centros de referencia existentes en España para la realización de dicha prueba diagnóstica. En este contexto, era de interés saber cómo había evolucionado en el tiempo la demanda de la prueba en nuestro medio y si esta modificaba su validez diagnóstica. Era importante, asimismo, intentar mejorar la sensibilidad y especificidad de la prueba mediante el uso de diferentes anticuerpos frente a proteína 14-3-3 y establecer la naturaleza de patrones atípicos de resultado de proteína de 14-3-3. Por otra parte, dentro de los estudios de asociación genética en EET, el gen de proteína tau resultaba ser un gen candidato atractivo que no había sido previamente analizado. Finalmente, no existía ningún estudio sobre las características de la población catalana de enfermedades por priones humanas que nos permitiera compararla con otras poblaciones caucásicas, facilitar la

detección de nuevos casos y errores diagnósticos, o identificar posibles modificaciones que se puedan producir en un futuro.

En el **trabajo 1** se analiza la evolución de la demanda de la prueba de proteína 14-3-3 a nuestro laboratorio, y se demuestra un aumento anual durante el periodo 1997-2000; de forma paralela se producía una disminución del valor predictivo positivo (VPP) de la prueba, mientras que el valor predictivo negativo (VPN), la sensibilidad y la especificidad no variaban significativamente.

El aumento de la demanda podía explicarse por la difusión de la prueba entre la comunidad médica tras su inclusión de la prueba como criterio diagnóstico de la Organización Mundial de la Salud y el aumento del interés por las enfermedades por priones tras la aparición de la forma variante de ECJ (vECJ). Paralelamente a este aumento de la demanda de la prueba en el período estudiado se producía una disminución de su VPP por un aumento en el número de falsos positivos. El acúmulo de proteína 14-3-3 en LCR es un marcador de destrucción neuronal severa y aguda, y se puede producir de forma transitoria en múltiples procesos neurológicos. Su utilidad en el diagnóstico de la ECJ se ha demostrado una vez se han excluido procesos frecuentes como ictus, neoplasias primarias o secundarias del sistema nervioso, encefalitis víricas o bacterianas, crisis tónico-clónicas generalizadas prolongadas, etc. Sin embargo, que hasta en un 25% de los falsos positivos detectados en nuestra serie, una prueba de neuroimagen (TC o RM) o un análisis básico del LCR hubiera descartado el diagnóstico de ECJ de forma previa a la realización de la prueba de proteína 14-3-3, nos indica que la solicitud de la prueba se realiza en algunos casos en una fase demasiado precoz del proceso diagnóstico. Asimismo, la contaminación hemática del LCR es otra causa de falsos positivos: un líquido hemático no es válido para la realización de la prueba y debe ser descartado. Por otra parte, en la mayor parte de los falsos positivos el aumento de

proteína 14-3-3 es transitorio (reflejando un insulto neuronal agudo) y la prueba se negativiza en una segunda determinación; por este motivo, en caso de una prueba positiva, si la sospecha clínica de ECJ es baja, este resultado debería ser confirmado en una segunda determinación en un plazo de dos o tres semanas.

El valor predictivo negativo (VPN) de la prueba de 14-3-3 para el diagnóstico de EET se mantuvo en niveles cercanos al 95%, lo que quiere decir que un resultado negativo hace poco probable el diagnóstico de ECJ en nuestro medio. No obstante, hay que tener en cuenta que si la sospecha diagnóstica se realiza en fases iniciales de la enfermedad, en los que el proceso de destrucción neuronal no es todavía extenso, la prueba 14-3-3 puede ser con más frecuencia negativa. Cabe resaltar, además, que existen formas de EET en los que la prueba es reiteradamente negativa, como el IFL o con frecuencia negativa, como en el GSS, la vECJ o el subtipo MV2 de ECJ esporádica.

En el subgrupo de casos de ECJ confirmados neuropatológicamente, la prueba realizada en nuestro laboratorio presenta una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de ECJ esporádica, con valores similares a otros centros de diagnóstico de enfermedades por priones reconocidos internacionalmente.

En el **trabajo 2** se evalúa la eficiencia diagnóstica de los anticuerpos frente a las distintas isoformas de proteína 14-3-3 (β , ϵ , γ , τ y ξ) comparándolos con el anticuerpo estándar que reconoce todas las isoformas y que es el habitualmente utilizado en nuestro laboratorio en la prueba de proteína 14-3-3. Sólo los anticuerpos dirigidos frente a las isoformas β y γ presentaban una sensibilidad similar al estándar para la detección de proteína 14-3-3 en LCR de pacientes con ECJ. Estos anticuerpos mantenían también el mismo nivel absoluto de especificidad que el estándar, aunque algunas muestras presentaban con estas bandas atípicas de positividad y ninguno de ellos consiguió

mejorar los resultados del estándar. Por lo tanto, el anticuerpo estándar se demostró como el más adecuado para la realización de la prueba de proteína 14-3-3 con fines diagnósticos.

En este trabajo 2 se estudia, también, la naturaleza de los patrones atípicos de positividad en el inmunoblot de proteína 14-3-3, demostrándose que estos resultan de una reacción cruzada del anticuerpo anti-proteína 14-3-3 con cadenas ligeras de inmunoglobulinas libres en LCR. La banda inferior presente en patrones atípicos corresponde a pesos moleculares ligeramente menores al de la proteína 14-3-3. Los patrones de reactividad atípica se presentan en LCR de pacientes con algunos cuadros neurológicos diferentes de ECJ que clínicamente pueden ser sugestivos de enfermedad por priones. A través de una serie de experimentos seriados se pudo demostrar que el origen de esta banda se encontraba en una reacción cruzada de los anticuerpos anti-14-3-3 con cadenas ligeras libres en LCR y no en un acúmulo de proteína 14-3-3 propiamente, por lo que estos patrones atípicos en un inmunoblot de proteína 14-3-3 realizado para diagnóstico de ECJ deben ser considerados como resultados negativos.

En el **trabajo 3** se presentan los resultados del análisis del polimorfismo del exón 1 del gen *Tau* en pacientes con EET. No se ha demostrado que existan diferencias en la distribución alélica o genotípica del polimorfismo del exón 1 entre los casos de EET y controles catalanes, por lo que este polimorfismo no modificaría la predisposición a padecer estas enfermedades. Tampoco se han podido demostrar diferencias respecto a la distribución de dicho polimorfismo entre los pacientes con distintos subtipos de enfermedad priónica o expresión clínica. Los resultados de este estudio parecen indicar, pues, que el polimorfismo del exon 1 del gen *Tau* no modifica la predisposición a padecer enfermedades por priones ni condiciona su expresividad.

En el **trabajo 4** se describen las características clínicas y genéticas de la serie de 72 pacientes con enfermedad priónica confirmada o probable identificados en Cataluña en el periodo enero 1993-diciembre del 2001. Los hallazgos de este estudio son concordantes con lo descrito en otras poblaciones caucásicas, y apoyan el concepto de que las enfermedades por priones humanas se presentan en estas con un patrón epidemiológico, fenotípico y genético homogéneo.

La incidencia global de enfermedades priónicas en este periodo fue de 1,3 casos/millón de habitantes-año, siendo el de la forma esporádica de ECJ de 1,2 casos/millón de habitantes-año. Un 87,5% de los casos correspondían a la forma esporádica de ECJ, un 11% a formas familiares y sólo se registró un caso de origen yatrogénico. No se detectó ningún caso sugestivo de la forma variante de ECJ. La incidencia específica por edad aumentaba hasta establecerse la máxima incidencia en el grupo de 60 a 69 años y era rara en adultos jóvenes. Los síntomas más frecuentes de inicio eran el deterioro cognitivo y la ataxia, con una evolución rápida hacia la afectación de múltiples áreas cerebrales y un supervivencia mediana de 3 meses. El 65% de los casos fueron confirmados patológicamente.

La distribución del polimorfismo del codon 129 del gen *PRNP* en nuestros casos de ECJ esporádico es significativamente diferente a la de los controles sanos, existiendo una sobrerrepresentación del genotipo metionina-metionina entre los casos, de forma consistente con los datos previamente publicados de otras poblaciones caucásicas. Los pacientes homocigotos para valina presentaban con menor frecuencia los típicos complejos periódicos en el electroencefalograma (EEG) y una tendencia a una supervivencia más larga.

La prueba de la proteína 14-3-3 (96%) resultaba ser más sensible que la presencia de complejos periódicos típicos en el EEG (60%) para el diagnóstico de ECJ esporádica. En nuestro estudio, la prueba de la proteína 14-3-3 se ha mostrado especialmente útil en los casos homocigotos valina-valina. La neuroimagen, especialmente la RM, se demostraba útil para excluir la existencia de otros procesos que pudieran originar la clínica, sin embargo los signos considerados típicos de ECJ esporádica se describían en un porcentaje mucho menor que en otras poblaciones europeas. Ya que no existían diferencias en nuestra población que pudieran explicar esta discrepancia junto al hecho de que fases iniciales de la enfermedad las alteraciones en la neuroimagen pueden ser sutiles o consideradas como no patológicas, sugiere que esta diferencia se debe a un sesgo en la observación que habría de ser tenido en cuenta a la hora de evaluar un informe radiológico.

En nuestra serie, la ECJ familiar asociada a una mutación puntual en el codon 200 del gen *PRNP* fue la forma más frecuente de enfermedad priónica de origen genético. Un alto porcentaje se presentaron sin historia familiar conocida sugestiva de enfermedad priónica. Así, el origen familiar de la enfermedad se estableció en estos pacientes al detectar una mutación en el análisis genético, enfatizando la importancia de realizar un estudio genético completo en todo paciente en el que exista una sospecha de enfermedad por priones, aún a pesar de la ausencia de antecedentes familiares. Los casos genéticos presentaban con más frecuencia que los ECJ esporádicos características clínicas atípicas iniciales como neuropatía axonal, sordera neurosensorial, o crisis epilépticas refractarias. En estos casos, tras descartarse otros posibles orígenes de la clínica, la positividad de la prueba de proteína 14-3-3 y la evolución progresiva sin respuesta terapéutica condujeron finalmente al diagnóstico de ECJ, confirmado posteriormente en el estudio necrópsico.

V. CONCLUSIONES

C1. El número de pruebas de proteína 14-3-3 en LCR solicitadas a nuestro laboratorio se ha incrementado a lo largo del periodo 1997-2000. Paralelamente, han aumentado el número de falsos positivos y disminuido el valor predictivo positivo de la prueba . Las causas más frecuentes de FP pueden y deben ser excluidas por la evaluación clínica y las pruebas complementarias apropiadas. Un resultado negativo es altamente predictivo de ausencia de la enfermedad en nuestro medio.

C2. Los anticuerpos frente a las diferentes isoformas de proteína 14-3-3 no aumentan la sensibilidad ni la especificidad obtenida con el anticuerpo estándar para el diagnóstico de ECJ. La banda inferior característica de patrones de positividad atípicos de la prueba de 14-3-3, se origina por una reacción cruzada del anticuerpo anti-proteína 14-3-3 con las cadenas ligeras de inmunoglobulinas libres presentes en el LCR.

C3. No existe evidencia, en nuestra población, de asociación entre el polimorfismo del exón 1 del gen *Tau* y la predisposición a padecer enfermedades priónicas, o el perfil de expresión clínico de la enfermedad.

C4. La distribución de los subtipos etiológicos y de las características genéticas y clínicas de los pacientes catalanes con enfermedades priónicas es similar a lo descrito en otras poblaciones europeas. Existe una sobrerrepresentación del polimorfismo metionina-metionina en los pacientes con ECJ esporádica con respecto a los controles normales. Hasta un tercio de las formas genéticas diagnosticadas carecían de antecedentes familiares conocidos. Las formas valina-valina de ECJ esporádica y las formas genéticas presentan con más frecuencias manifestaciones clínicamente atípicas. No se ha detectado ningún caso de variante de ECJ en Cataluña en el periodo estudiado.