



FACULTAD DE
CIENCIAS

Microbiología clínica

Grado en Bioquímica

Departamento de Biología Molecular

U. A. M. © 2014



Tema 2. Enfermedades causadas por priones:

Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

Microbiología Clínica
4º Grado Bioquímica
Curso 2013-2013



Alba Marín Moreno
Laura Márquez Expósito
Patricia Suárez Rodríguez
Marta Vadillo Bachiller

Índice

<u>1. Introducción</u>	Página 2
<u>2. Biología del agente infeccioso</u>	Página 3
<u>3. Enfermedades priónicas en humanos</u>	Página 3
<u>4. Aspectos moleculares de la patogénesis</u>	Página 4
<u>5. Tropismo de especie y barrera de especies</u>	Página 6
<u>6. Cepas, aislados y tipos de priones</u>	Página 7
<u>7. Una teoría unificadora de cepas y barrera de especie</u>	Página 8
<u>8. Aproximaciones al tratamiento de las enfermedades TSE</u>	Página 8
<u>9. Bases moleculares de la patología de las enfermedades priónicas</u>	Página 9
<u>10. Cuestiones por resolver</u>	Página 10
<u>Bibliografía</u>	Página 11

1. Introducción

Los priones son los agentes infecciosos más simples que existen. Se trata de proteínas con la capacidad de inducir enfermedades neurodegenerativas muy graves y además transmisibles. La capacidad infecciosa de los priones ha supuesto la ruptura del dogma central de la Biología Molecular donde se propone que la información solo es portada por los ácidos nucleicos. Y es que la estructura y la secuencia de aminoácidos de estas proteínas priónicas van a tener la información suficiente para poder ser transmitida a otras proteínas y así acabar desarrollando dichas enfermedades.

Actualmente se define como prión a toda proteína codificada en el genoma que ha experimentado un cambio conformacional de tal forma que la molécula alterada es capaz de promover la alteración de la molécula normal. Además, cada vez está más extendida la idea de que los priones no son una alteración biológica, sino que probablemente dichas proteínas son piezas importantes de los mecanismos reguladores de la célula.

Las alteraciones conformacionales que constituyen los priones, son autoreplicantes y pueden ser transmitidas entre células y organismos, haciendo que los caracteres asociados sean transmitidos como enfermedades infecciosas (como ocurre en mamíferos) o hereditarios en la división celular (como ocurre en hongos). Hasta ahora, los priones se han descrito en dos especies de hongos, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo multicelular *Podospora anserina*. En estos organismos, hasta ahora, 9 proteínas han sido confirmadas como priónicas. Estas proteínas constituyen, por tanto, un sistema epigenético que ha evolucionado en base a que pueden modificar de una forma muy rápida el fenotipo celular en respuesta a un cambio ambiental sin necesidad de introducir cambios en la secuencia o función del genoma.

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE, “Transmissible Spongiform Encephalopathies”) o enfermedades priónicas son un grupo inusual de enfermedades neurodegenerativas que se transmiten entre individuos por la inoculación o ingestión de cerebro enfermo u otros tejidos. Dentro de este tipo de enfermedades se encuentran el “scrapie” en las ovejas, la encefalopatía espongiforme bovina (o mal de las vacas locas) en vacas, y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el kuru y el síndrome Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) en humanos.

El “scrapie” es una enfermedad en ovejas descrita hace unos 200 años en Europa. La naturaleza infecciosa de esta enfermedad fue reportada en 1899 por Besnoit y, posteriormente, se demostró que era debida a un agente de naturaleza filtrable. El mecanismo de la transmisión permanece incierto, pero se sugiere que la placenta u otros tejidos, desprendidos en el momento del parto, pueden contaminar los pastos, y así pasar a infectar a las ovejas que se alimenten de ellos.

La aparición en Inglaterra en 1986 de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, “bovine spongiform encephalopathy”) y que rápidamente se convirtió en una gran epidemia, se atribuyó a la transmisión del “scrapie” de las ovejas a las vacas a través de alimentos contaminados preparados a partir de restos de ovejas. Alternativamente, la epidemia también pudo ser producida por el reciclaje de casos de BSE esporádicos, dado que las vacas también fueron empleadas para producir alimentos para vacas.

Más de 180.000 casos de BSE se han confirmado en el Reino Unido, aunque el número total de animales infectados se ha estimado en más de dos millones. BSE también se ha producido en otros países (principalmente europeos), con epidemias significativas en Suiza, Irlanda y Portugal. Además, lo que resultó aún más preocupante es que estas enfermedades podían ser transmitidas entre especies por inoculación o a través de la dieta. De hecho, unas 200 personas han muerto, la mayoría en Reino Unido, por la TSE conocida como variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, “variant Creutzfeldt-Jakob disease”). Existen datos experimentales que apoyan la teoría de que esta enfermedad está causada por la misma especie de prion que causó la BSE.

Otro ejemplo de cómo estas enfermedades se transmiten lo encontramos en la transmisión del kuru en las tribus de Papua Nueva Guinea, debida a las prácticas caníbales, de comer a sus familiares muertos. Afortunadamente, estas prácticas dejaron de hacerse a finales de los años 50.

Todas estas enfermedades son causadas por la proteína priónica PrP (“prion protein”). El término “prión” fue acuñado en 1982 por Stanley Prusiner para referirse al agente causante de las enfermedades TSE y que se encuentran entre los agentes más letales, pues van a producir un 100% de mortalidad una vez que aparecen los primeros síntomas clínicos.

Las TSEs se han descrito en muy diferentes especies de animales: humanos, ratones, ovejas, vacas, cerdos, gatos, etc. El agente infeccioso en los animales enfermos se encuentra principalmente en cerebro, médula espinal y tejidos linfoides (bazo, nódulos linfáticos y timo). Sin embargo, los procesos patológicos parecen ocurrir sólo en el Sistema Nervioso Central (SNC).

La demencia y la ataxia cerebelar son los síntomas clínicos más habituales. La patología ocurre principalmente en el SNC y se caracteriza por una astrocitosis severa, acompañada de una vacuolización y pérdida de neuronas, lo que da un aspecto espongiforme al tejido nervioso afectado. Además, con frecuencia se observan fibras o placas amiloides de la proteína PrP afectada (Figura 1).

Estas enfermedades no llevan asociado un proceso inflamatorio o respuesta inmunitaria celular o humoral, ya que estos agentes infecciosos no son iguales al resto (virus, bacterias, parásitos), no son un agente extraño, son las propias proteínas celulares que han sufrido un proceso de transformación que las convierte en proteínas patológicas.

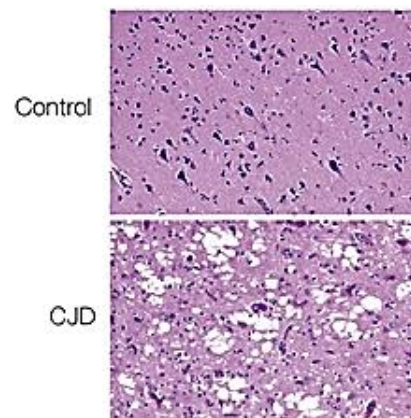


Figura 1. Histopatología de tejido nervioso no afectado (control) y afectado por la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD). Observamos la vacuolización y aspecto espongiforme que adquiere el tejido nervioso afectado por el agente priónico. (A. Aguzzi *et al.*, 2001)

2. Biología del agente infeccioso

A finales del siglo XIX, demostraron mediante experimentos de ultrafiltración, que “el scrapie” era producido por un agente infeccioso filtrable, pero difícil de purificar. Además, las técnicas de ultracentrifugación, pusieron de manifiesto una gran heterogeneidad en el tamaño del agente infeccioso (20-100nm) y un grave problema para la caracterización del mismo es que con frecuencia era difícil diferenciar entre el pico del agente infeccioso y el resto de material biológico.

Lo que sí se observó pronto es que los agentes TSE eran mucho más resistentes a la inactivación por luz UV o radiación ionizante que cualquiera de los virus analizados. Dado que el principal efecto de la radiación se ejerce sobre los ácidos nucleicos, esto hizo pensar que los agentes TSE tendrían un genoma muy pequeño o un sistema extremadamente eficiente de reparación. También se observó que los agentes TSE eran mucho más resistentes que los virus frente a tratamientos químicos, tales como el formaldehído. De hecho, esto explica el elevado número de casos de infección por priones en intervenciones quirúrgicas, debido a una incompleta inactivación con formaldehído, que era utilizado para la esterilización del material quirúrgico.

Los análisis bioquímicos sobre extractos de cerebro con “scrapie”, enriquecidos con el agente infeccioso, mostraban la presencia de una proteína resistente a proteasas, nombrada como PrP o proteína prión, como el agente infeccioso causante del “scrapie”.

A partir de la secuenciación de la proteína priónica, se pudo clonar el cDNA PrP utilizando muestras de RNA procedentes de cerebros con “scrapie” de ratón y hámster. Lo sorprendente fue descubrir que el mRNA PrP no era específico de cerebros con “scrapie”, sino que es expresado en niveles similares en animales normales y en animales infectados con “scrapie”. Asimismo, se vio que la proteína PrP se expresa en muchos otros tipos de células y tejidos además del cerebro.

La paradoja de que la proteína PrP estuviera presente tanto en cerebros enfermos como en sanos se resolvió al encontrar que la PrP asociada a TSE es resistente a proteasas (PrP-res) mientras que la PrP normal es sensible a proteasas (PrP-sen). Con frecuencia a la proteína PrP-res se le conoce como PrP^{Sc} (PrP de “scrapie”) mientras que a la PrP-sen se le conoce también como PrP^C. La transformación de la PrP-sen normal a la PrP-res es la causa de la patogénesis de las enfermedades TSE (Figura 2).

La PrP-res se detecta mediante “Western-blot” en extractos de cerebros de todas las enfermedades TSE en todos los animales susceptibles, y este procedimiento es el mejor método de diagnóstico de estas enfermedades (Figura 3).

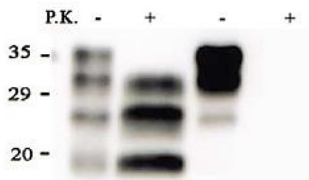


Figura 3. Western Blot para detectar la presencia de PrP^{Sc} resistente al tratamiento con la Proteinasa K. Se observa que tras el tratamiento con proteínasa K de extractos de tejidos de animales sospechosos, en los casos que se sigue detectando bandas con los anticuerpos anti-PrP, se puede concluir que el animal está infectado con la PrP-resistente. (Figura adaptada de Aguzzi y Polymenidou, 2004)

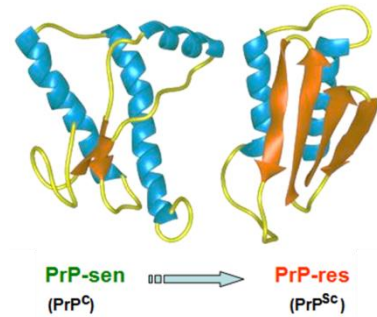


Figura 2. Cambio conformacional de la proteína PrP celular (PrP-sen) tras su conversión a PrP patológica (PrP-res)

3. Enfermedades priónicas en humanos

Se trata de desórdenes neurodegenerativos raros (con una incidencia mundial de aproximadamente una persona por millón y por año). Sin embargo, en los últimos años ha crecido el miedo hacia estas afecciones al comprobarse que, a través de usos dietéticos, son verdaderas amenazas para la salud pública.

En humanos las enfermedades espongiformes transmisibles (o TSE) se dividen en tres grupos: infecciosas, familiares y esporádicas. Las enfermedades de los tres grupos pueden ser transmitidas a primates a través de la ingestión de cerebro.

1. TSE infecciosa. Este grupo lo forman el Kuru (relacionado con prácticas de canibalismo), la TSE iatrogénica y la variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (vCJD). En las tres ha existido un contacto con el agente infeccioso.

Muchos casos de TSE iatrogénicas tienen su origen en la utilización de utensilios quirúrgicos no adecuadamente esterilizados. Así, casos de TSE iatrogénica se han desarrollado en personas receptoras de un trasplante de córnea o sometidas a neurocirugía. Esto es debido a que los priones se adhieren fácilmente a los objetos metálicos, además de que son resistentes al paraformaldehído, sustancia que se utiliza para la esterilización del material quirúrgico. Asimismo se han descrito 226 casos asociados a la inoculación de la hormona de crecimiento, que se aislaba de glándulas pituitarias de cadáveres, y 228 casos en personas que han recibido trasplantes de duramadre (procedentes probablemente de cadáveres con enfermedad CJD no diagnosticada).

La vCJD está relacionada con la enfermedad espongiforme bovina (o BSE) porque sus neuropatologías muestran características distintivas del resto de enfermedades priónicas en humanos. La mayoría de los casos se asocian al consumo de carne contaminada, aunque se han descrito 4 casos de vCJD que podrían estar asociados a transfusión sanguínea, lo que sugiere que los priones de BSE podrían estar recircularizando entre humanos.

También se ha visto que todos los casos de vCJD están asociados a determinados haplotipos del gen codificante de la proteína PrP. Todos los casos de vCJD han ocurrido en personas que eran homocigotos para el aminoácido metionina en la posición 129 de la proteína priónica, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Genotipo del codón 129 del gen codificante para PrP

Frecuencia del genotipo (%)	MM	MV	VV
Población caucásica normal	38	51	11
CJD esporádica	71	15	14
CJD variante	100	0	0

2. TSE familiar. Dentro de esta categoría están la CJD familiar (cuyo síntoma clínico principal es la demencia) y GSS familiar (que cursa con ataxia cerebelar como síntoma clínico principal). A este grupo pertenece también la enfermedad fatal del insomnio (FFI, “fatal familiar insomnio”). Estas enfermedades se relacionan con la presencia de una alteración genética dominante autosomal del gen PrP. Se asocian con mutaciones patogénicas o inserciones en la fase de lectura abierta del gen PrP.
3. TSE esporádicas. Suponen un 85% de las enfermedades por priones, y la más común es la CJD esporádica. En estos casos no se ha encontrado asociación a un proceso de infección priónica por contacto con tejidos de personas o animales infectados ni tampoco los pacientes poseen alteraciones genéticas en el gen PrP con predisposición al desarrollo de las formas priónicas. La hipótesis aceptada actualmente es que se haya podido producir una mutación somática en el gen PrP o que de forma espontánea la proteína PrP puede experimentar cambios al azar en su estructura que conduzcan a la adquisición de una conformación propensa a desarrollar la enfermedad.

- **Localización de las TSE en el SNC**

La CJD familiar y la CJD esporádica están asociadas a pérdida de memoria y se debe a una localización preferencial de los priones en el córtex del cerebro. En la enfermedad del insomnio fatal se acumulan en el tálamo. En el GSS y el Kuru se encuentran principalmente en el cerebelo, por eso los pacientes tienen dificultad para reejecutar los movimientos. En el tallo es donde se acumulan los priones responsables de la vCJD (relacionada con la BSE) (Figura 4). Esta enfermedad tiene múltiples síntomas: desgana, dificultad para memorizar, pérdida de control sobre el movimiento muscular, problemas de habla.

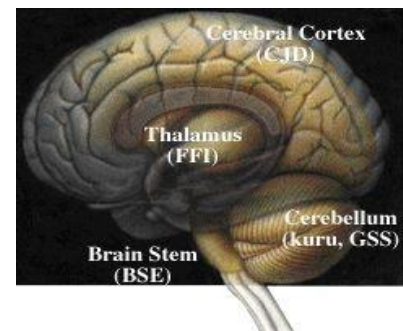


Figura 4. Las diferentes enfermedades, y sus síntomas, están relacionadas con una diferente localización de los priones en el cerebro.

4. Aspectos moleculares de la patogénesis

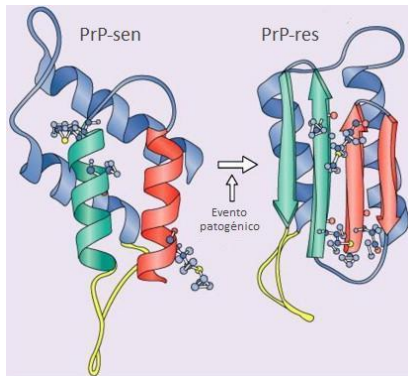


Figura 5. Conversión de PrP-sen a PrP-res. Durante la conversión la estructura secundaria resulta alterada: las alfa-hélices coloreadas de rojo y verde en la estructura de PrP-sen adoptan una estructura en hoja-beta en PrP-res. (Figura adaptada de *du Plessis, 2008*)

Es muy importante recordar que la enfermedad no la produce el agente infeccioso que ingerimos, si no la transformación de nuestras proteínas sanas en proteínas priónicas. Por ello, es importante conocer en qué difieren la PrP-res (patogénica) de la PrP-sen (normal). Hay que tener en cuenta que ambas son codificadas por el mismo gen, por lo que las diferencias entre ellas parecen ser conformacionales y quizás también puedan deberse a interacciones diferenciales con cofactores. No se conocen las estructuras terciarias de las proteínas normales o priónicas, pero sí se sabe que la PrP-res tiene mayor contenido en estructura secundaria hoja beta mientras que la PrP-sen posee mayor contenido en alfa-hélice (Figura 5).

La proteína PrP se sintetiza inicialmente como un polipéptido de 254 aminoácidos que posee un péptido señal de 22 aminoácidos en el extremo N-terminal (que es retirado durante la biosíntesis), y además otros 23 aminoácidos en el extremo C-terminal se eliminan también cuando la proteína se ancla al glicosilfosfatidilinositol o GPI. Así finalmente la proteína madura está formada por 209 aminoácidos. Esta proteína, como una típica glicoproteína de membrana plasmática, comienza su ciclo en el retículo endoplasmático, donde sufre glicosilación de restos de manosa (la proteína tiene dos sitios posibles de glicosilación) y adquiere el anclaje GPI. Este proceso de glicosilación continúa en el aparato de Golgi, desde donde la proteína ya madura y glicosilada es translocada a la membrana. Sin embargo, la PrP-res es resistente al tratamiento con proteínasa K (proteasa), por lo que sufre un recambio menor y de ahí que se produzca su acumulación in vivo. Esta resistencia puede alcanzarse a través de dos vías (Figura 6): o bien en la membrana plasmática, debido a la interacción de PrP-res con PrP-sen directamente o en vías endocíticas, lo que explica la observación de agregados de PrP-res en lisosomas secundarios. Así, la PrP-res se acumula en la superficie celular, en lisosomas en el

interior celular y también en espacios extracelulares donde se forman grandes acúmulos en forma de placas amiloides y fibrillas, características clínicas que acompañan al desarrollo de las encefalopatías espongiiformes.

Parece ser que la transformación requiere la desnaturalización parcial de la proteína PrP-sen, lo que resultaría favorecido en un medio ácido. La hipótesis aceptada es que la PrP-res se une directamente a PrP-sen y la obliga a adquirir la estructura resistente a proteasas, que va a ser también responsable del desarrollo de las TSE. Esta transformación se ha podido seguir experimentalmente mediante la utilización de isótopos radiactivos: la incubación de PrP-sen radiactiva con PrP-res conduce a la aparición, al cabo de un tiempo, de PrP-res con marca radiactiva, indicando que se había producido una transformación de la proteína normal en la proteína resistente. Además, este tipo de experimentos han servido para explicar el fenómeno de barrera de especies. Así, se vio que la PrP-res de hámster es incapaz de promover la conversión de la PrP-sen de ratón en la forma resistente a proteasas, mientras que la PrP-res de ratón sí induce la conversión, aunque de forma parcial, de la PrP-sen de hámster. También estos experimentos han servido para demostrar que las cepas de priones transmiten sus características estructurales a las PrP-sen. Así, cuando PrP-sen radiactiva es incubada con cepas que difieren en las movilidades electroforéticas de la región resistente a PK, la PrP-res convertida y radiactiva, muestra las mismas propiedades de la PrP-res que actuó de molde.

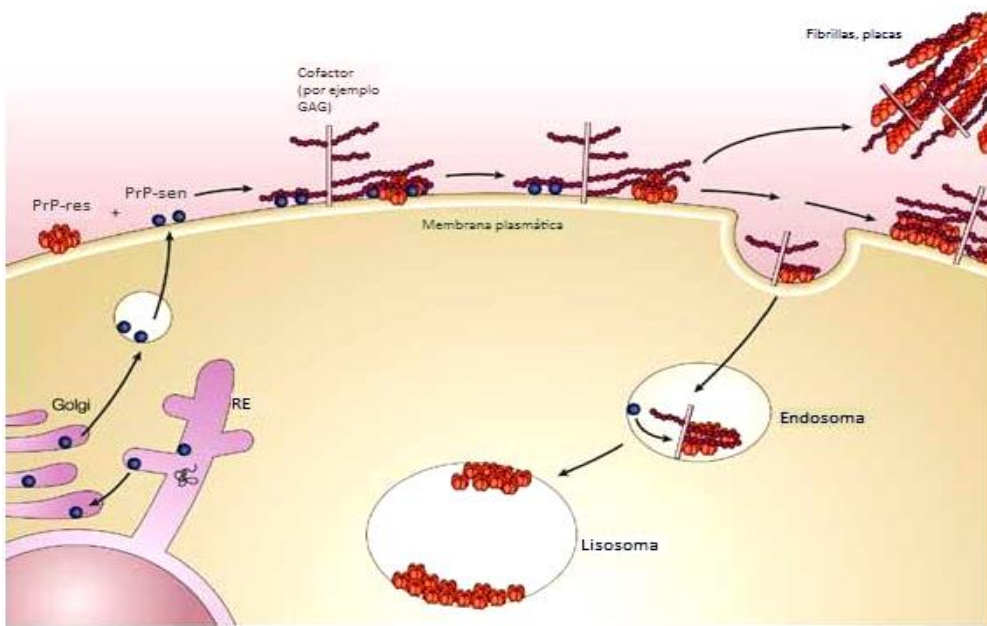


Figura 6. Biosíntesis de las proteínas PrP-sen y su transformación en PrP-res. La interacción de PrP-sen con la forma priónica (PrP-res) conduce a la formación de placas amiloides por la agregación de estas proteínas priónicas tanto en el interior como en el exterior celular. (Figura adaptada de *Cashman & Caughey, 2004*)

Existe una técnica denominada PMCA (“protein misfolding cyclic amplification”) que permite producir in vitro grandes cantidades de PrP-res. Este método, además de su valor diagnóstico, ha ayudado a mejor entender el modo de propagación de los priones. Consiste en coger tejido de un animal sano y poner una muestra que pueda tener la enfermedad. Se incubaba a 37°C, durante este tiempo la proteína PrP-res interacciona con la proteína celular normal y la transforma en la forma priónica, que agregará elongando las fibras. A continuación, la muestra se somete a ultrasonidos (sonicación), como resultado las fibras se van a partir y generar nuevos sitios de nucleación, donde se unirán nuevas PrP-sen que se transformarán a PrP-res (Figura 7). Este proceso si se repite un número de veces conduce a una amplificación muy significativa de la cantidad de proteína priónica con respecto a la existente inicialmente en la muestra. Si no se somete a ultrasonidos la producción de proteína resistente es considerablemente menor.

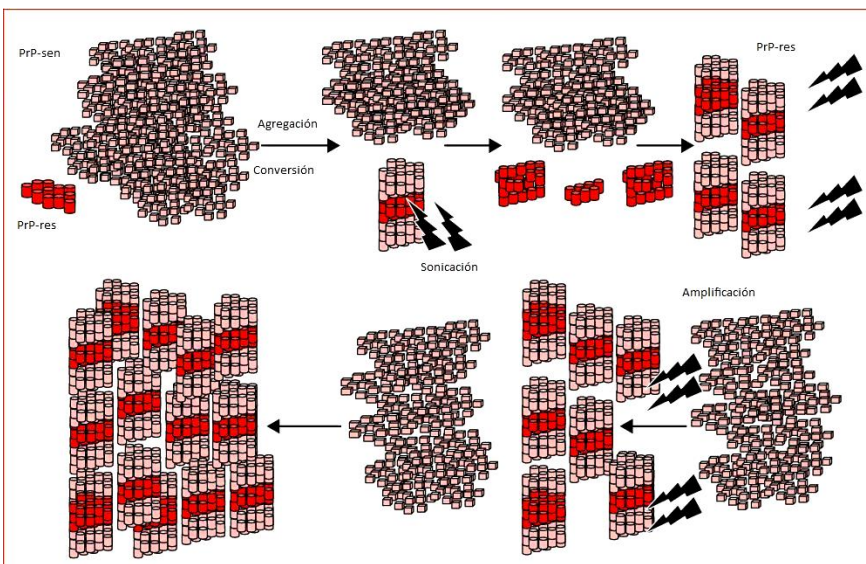


Figura 7. Fundamento de la técnica de amplificación PMCA. Extractos de PrP-sen se mezclan con muestras en las que se quiere diagnosticar una posible infección priónica. Si existe PrP-res, ésta va a dirigir la transformación de moléculas PrP-sen para dar lugar a fibras o agregados de proteína PrP-res. La rotura por ultrasonidos de estas fibras va a generar nuevos sitios de nucleación (PrP-res coloreada en rojo) para que se unan las proteínas normales y se transformen a más proteínas PrP-res (rosa). La cantidad de proteína PrP-res se amplifica de forma exponencial tras cada ciclo de sonicación e incubación. (Figura adaptada del libro de *Lefrère, 2007*)

5. Tropismo de especie y barrera de especies

Un aspecto destacable de los agentes TSE es su especificidad de especie. Se sabe que estos agentes pueden pasar de una especie a otra, pero normalmente la transmisión a través de especies es más difícil que la transmisión dentro de la misma especie. Y cuando se produce la transmisión, el tiempo de incubación hasta que se desarrollan los síntomas clínicos es más prolongado que cuando se inoculan en la especie en la que se aislaron. Esta característica es conocida como “barrera de especie” (Figura 8).

Cuando se inoculan priones de una especie B a una especie A, normalmente sólo unos pocos animales de la especie A desarrollan la enfermedad. Aquellos que la sufren lo hacen con periodos de incubación más largos que cuando los priones son transmitidos dentro de la misma especie, donde típicamente todos los animales inoculados sucumben en un periodo relativamente corto. Pero cuando se inoculan nuevos animales de la especie A con priones procedentes de individuos de la especie A, que habían desarrollado la enfermedad, los parámetros se hacen más homogéneos, todos los animales desarrollan la enfermedad y de una forma rápida. Se habla de un fenómeno de adaptación entre el prión y la proteína PrP^{sen}. Estos estudios indican que la propagación de los priones ocurre de forma más eficaz cuando la PrP^{Sc} y la PrP^c tienen la misma estructura primaria. Este hecho se le denomina también como “barrera de secuencia”. Los priones se van adaptando y se propagan mejor cuando existe una similitud de secuencias entre la proteína priónica y la proteína celular. La transformación y la propagación son más eficaces cuando la secuencia primaria de ambas proteínas es la misma.

Mediante aproximaciones experimentales se demostró que efectivamente la “barrera” era debida a la diferencia de estructura primaria entre las PrP de las especies donadora y receptora. Así, ratones transgénicos que expresan la PrP de hámster, al contrario que los ratones normales, son muy susceptibles a la infección de los priones de hámster.

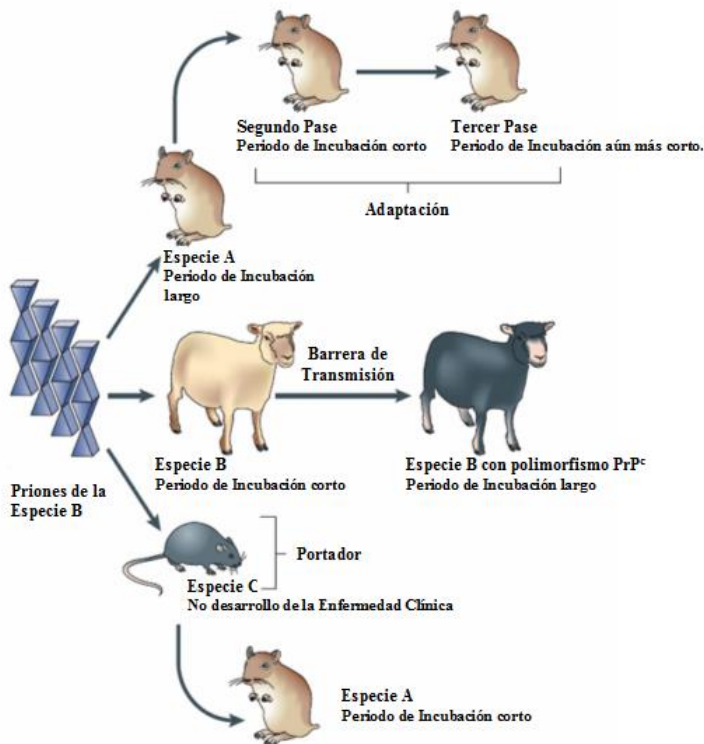


Figura 8. Barrera de especie:

Los priones aislados en una especie son a menudo menos infecciosos para otras especies, lo que se manifiesta en tiempos de incubación más largos y reducidas tasas de desarrollo de la enfermedad. La razón podría estar en la no identidad de secuencias entre la proteína priónica (PrP) y la correspondiente proteína en el hospedador, obstaculizando así el proceso de conversión. Después de pases seriales de los priones en animales de la misma especie, los tiempos de incubación gradualmente disminuyen (fenómeno conocido como adaptación). En algunos casos, la barrera de especie es tan fuerte que ciertos hospedadores no muestran ninguna enfermedad clínica después de la inoculación con priones de otras especies. Sin embargo, los aislados del cerebro de estos hospedadores aparentemente resistentes pueden transmitir la enfermedad cuando se inoculan a hospedadores susceptibles.

Hospedadores de la misma especie de la que procede el inóculo original, pueden exhibir tiempos de incubación notablemente más largos que pueden deberse a ciertos polimorfismos del gen *PRNP*, fenómeno que se conoce como “barrera de transmisión”. (Figura adaptada de Aguzzi et al., 2007)

A veces, la barrera de especies es tan fuerte que algunas especies animales no desarrollan síntomas clínicos tras la infección con priones procedentes de otras especies, posiblemente debido a diferencias en secuencia entre ambas especies. Sin embargo, los extractos de cerebro de estos animales aparentemente resistentes son capaces de transmitir la enfermedad cuando se inoculan en huéspedes susceptibles (Figura 8).

Finalmente, individuos de una misma especie, inoculados con la misma preparación de priones, pueden desarrollar la enfermedad tras muy diferentes periodos de incubación. Esto se debe a diferencias polimórficas en el gen PrP, fenómeno que se denomina “barrera de transmisión”.

No obstante, a veces, la barrera de transmisión entre especies se mantiene aun cuando la secuencia de la PrP^c es idéntica entre el donante y el receptor. Por ejemplo, no se produce la enfermedad cuando ratones que expresan la proteína PrP^c humana son infectados con priones de la enfermedad variante de Creutzfeldt-Jakob. Esto sugiere que además de la proteína PrP^c se requieren otros componentes, presentes en el donante, que no están presentes, o no interaccionan de forma adecuada, en el receptor. A este hecho se le denomina como “barrera celular”.

Finalmente, cabe mencionar que dos cepas de priones, originadas en el mismo donante y, por tanto, teniendo la misma secuencia, pueden mostrar diferentes infectividades en un receptor que expresa la misma PrP^c. Por ejemplo, los priones de la forma esporádica de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob son altamente infecciosos en ratones transgénicos para la PrP^c humana. Este fenómeno se le conoce como “barrera de cepa”.

6. Cepas, aislados y tipos de priones

Para comprender mejor la naturaleza de los priones y las patologías que causan es importante considerar la existencia de diferentes “cepas de priones” dentro de una misma especie animal. Las cepas se diferencian en aspectos como el tiempo de incubación necesario para desarrollar la enfermedad, las características histopatológicas de las lesiones producidas, las dianas neuronales específicas y la capacidad para atravesar la barrera de especie.

Las cepas surgen de una misma proteína priónica que puede adoptar varias conformaciones auto-replicas. Se especula que son las propiedades fisicoquímicas de cada cepa las que serán responsables del ensamblaje de las proteínas priónicas en agregados, y estos agregados a su vez serán responsables de los fenotipos específicos de cada tipo de enfermedad.

Las cepas se pueden diferenciar de acuerdo al patrón de digestión con proteinasa K y su análisis mediante “Western blot” (Figura 3). Esta enzima va a cortar a PrP-res entre los residuos 87 y 91 dependiendo de la cepa de prión. Así, las propiedades que varían entre cepas son la susceptibilidad a la digestión con proteinasa K, la movilidad electroforética tras el tratamiento (lo que refleja variaciones en cuanto al sitio de corte de la proteinasa K en la zona N-terminal de la proteína priónica), la relación entre formas di-, mono- o no-glicosiladas que aparecen y la estabilidad frente a agentes desnaturalizantes.

En los ratones se han aislado, y también propagado, muchas cepas priónicas diferentes. Resulta curioso contrastar que tras sucesivas infecciones de ratones, cada una de las cepas mantiene características tales como los periodos de incubación y la neuropatología generada (Figura 9).

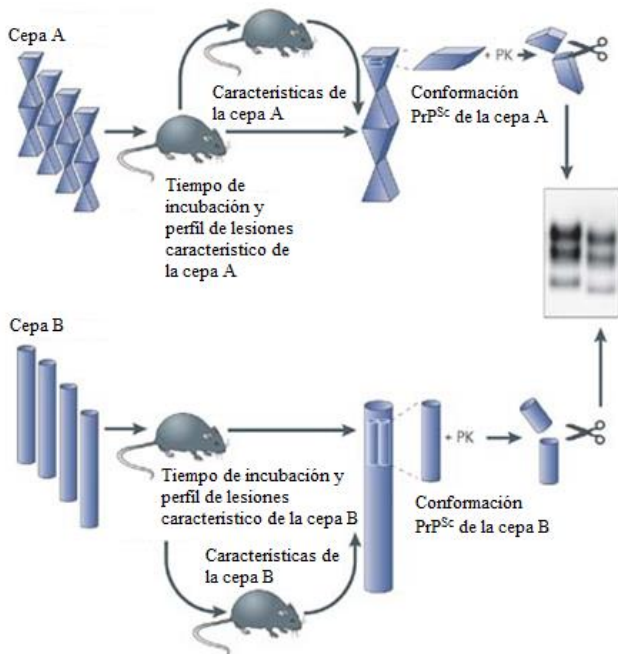


Figura 9. Variación entre cepas priónicas: La transmisión de diferentes cepas priónicas (cepas A y B) a huéspedes genéticamente idénticos resulta en distintos fenotipos de enfermedad, como tiempos de incubación y perfil de lesiones, que están determinados por el inóculo. Estas características persisten tras varios pases a nuevos huéspedes. En algunos casos las cepas exhiben características bioquímicas propias como la movilidad electroforética del “core” resistente a proteinasa K (como se muestra en los “western blots”). Esto se cree resultado de las diferentes conformaciones de la proteína priónica PrP^{Sc} , que llevan a la exposición de diferentes sitios de corte para la digestión enzimática (representados por tijeras). (Figura adaptada de Aguzzi et al. 2007)

Sabemos que las cepas no proceden de diferentes secuencias de PrP ya que la secuencia primaria de todas ellas es idéntica porque solo existe un gen que codifica la proteína.

No es fácil comprender cómo una misma cadena polipeptídica da lugar a diferentes conformaciones, y menos aún cómo estas cepas pueden mantener y propagar sus características bioquímicas que, además, finalmente van a ocasionar diferentes grados de patología. Por ejemplo, las diferentes cepas de PrP^{Sc} que afectan a humanos se caracterizan por generar diferentes fragmentos proteolíticos y relación de formas glicosiladas tras el tratamiento con proteinasa K, y cada una está asociada con distintos fenotipos clínico-patológicos de CJD. Cómo se mantienen las características estructurales y ratios de glicosilación sigue siendo una cuestión enigmática.

Pero, aún más, cuando se transmiten priones humanos o bovinos a ratones normales (que expresan la PrP_c de ratón), la PrP^{Sc} que se forma genera los mismos fragmentos proteolíticos y las ratios de glicosilación que el inóculo original. Esto demuestra la capacidad que tienen los priones de transmitir sus características estructurales. De hecho, las señas de identidad de los priones BSE se mantienen en varias especies de mamíferos, incluyendo los humanos (Figura 10).

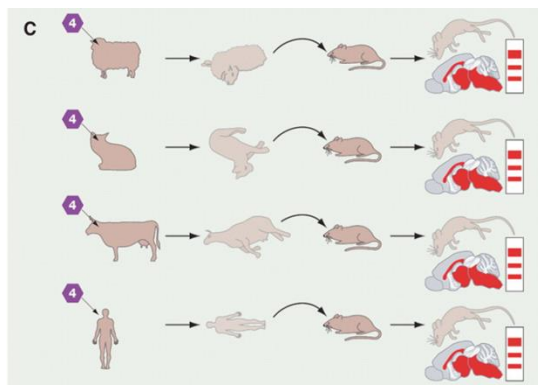


Figura 10. Las propiedades de una cepa pueden mantenerse tras un pase en diferentes especies animales, cada una con una distinta secuencia primaria de la proteína PrP. (Collinge J et al. 2007)

Estas cepas pueden inocularse de nuevo en ratones, y al caracterizarse las formas priónicas generadas se observa que mantienen todas sus propiedades tanto fisicoquímicas como de localización en el cerebro (Figura 10).

Por otro lado, en algunas enfermedades causadas por priones coexisten varias cepas de un mismo prión. Esto sucede en el “scrapie” de las ovejas y la enfermedad CJD en humanos. Se cree que en las diferentes poblaciones celulares de un mismo huésped se generan diferentes ambientes, que conducen a una selección de cepas. Incluso se ha llegado a postular que la infección de un huésped con una “cepa linfotrópica” que coloniza tejidos linfoides rápidamente pero con un periodo de latencia largo hasta que se produce la neuroinvasión, se podría deber en parte a la necesidad de un tiempo hasta que se produzca la selección de la “cepa neuroinvasora”. Esta hipótesis se basa en la existencia de diferentes tipos de PrP^{Sc} en los tejidos periféricos de pacientes de vCJD. En esta enfermedad la colonización de tejidos linfoides precede a la enfermedad neurológica.

7. Una teoría unificadora de cepas y barrera de especie

Los genes PrP están altamente conservados entre los mamíferos, lo que implica que las proteínas PrP tengan una estructura primaria muy parecida. Es posible que esta sea la razón fundamental que explica la capacidad de los priones para infectar a diferentes especies.

La teoría unificadora postula que una determinada PrP^{Sc} es capaz de adoptar varias conformaciones infecciosas debido a razones termodinámicas que están dictadas por la secuencia primaria de la proteína PrP. Debido a esto, sólo habrá propagación de un prión entre dos especies diferentes cuando sus proteínas PrP puedan adoptar estados conformacionales similares. No habrá propagación cuando la PrP de la especie receptora sea incapaz de adoptar una conformación similar a la PrP^{Sc} exógena, existiendo una barrera de transmisión o barrera de especie (Figura 11). Según esta teoría, la facilidad de transmitirse entre especies de un prión viene dada por el mayor solapamiento de estados conformacionales que las PrP^{Sc} de huésped y donador compartan.

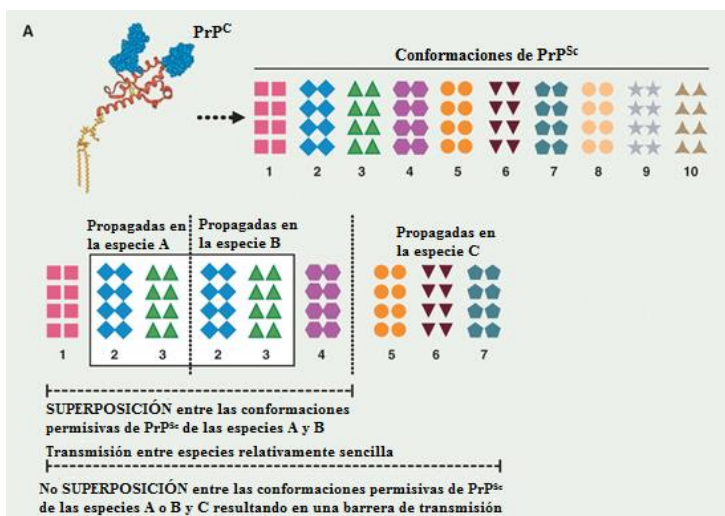


Figura 11. Teoría para explicar la barrera de transmisión entre especies de los priones: En su conjunto, un amplio rango de conformaciones pueden ser adoptadas por las proteínas PrP^{Sc} en mamíferos, pero solamente una parte son posibles para una estructura primaria dada. La facilidad de transmisión de los priones entre especies se relaciona con el mayor número (o superposición) de conformaciones permisivas de PrP^{Sc} compartidas por las dos especies. (Collinge J et al. 2007)

Como ya se ha indicado, el prion BSE tiene una alta capacidad de traspasar la barrera de especie. Esta cepa debe representar una conformación termodinámicamente muy favorable que se transmite con facilidad a un gran número de especies distintas, lo que explica la gran promiscuidad de esta cepa entre los mamíferos. Esta cepa fue seleccionada por un proceso industrial en el que los desechos animales se reciclaban, lo que probablemente favoreció la reinfección de animales, hasta generar la epidemia de BSE en Reino Unido. Además esta cepa es particularmente termoestable, lo que seguramente es un factor favorecedor del proceso.

Otro ejemplo ilustrador lo encontramos en el polimorfismo PrP humano M129V, conocido por determinar susceptibilidad genética a las enfermedades priónicas. Es destacable que todos los pacientes con vCJD ensayados (aproximadamente 200) son homocigotos para el alelo metionina en la posición 129 (este genotipo está presente en aproximadamente 1/3 de la población normal). La razón parece estar en que la valina en la posición 129 de la PrP humana no es capaz de adoptar la conformación asociada con la cepa BSE.

8. Aproximaciones al tratamiento de las enfermedades TSE

No existen terapias efectivas para el tratamiento de las enfermedades TSE en humanos. Esto se debe en parte a que cuando se observan los síntomas clínicos ya se han producido lesiones neuropatológicas. No obstante, en modelos animales de TSE se han identificado drogas capaces de inhibir la acumulación de PrP-res y retrasar la aparición de los síntomas clínicos. Estos inhibidores también se han utilizado como prueba del mecanismo de formación de PrP-res y su relación con la patogenicidad e infectividad. Con el objetivo de desarrollar tratamientos frente a estas enfermedades se han seguido diferentes aproximaciones:

- PrP heterólogas. Se ha observado que la presencia de PrP heterólogas en cultivos de tejidos infectados con “scrapie” bloquea la formación de PrP-res. La proteína PrP-sen heteróloga se une al sitio de conversión de PrP-res sin convertirse a la forma resistente al tiempo que interfiere en la unión de PrP-sen homóloga endógena (Figura 12). Estos datos plantean la posibilidad de que la terapia génica con PrP heteróloga expresada en el paciente pueda ser efectiva frente al desarrollo de TSE.

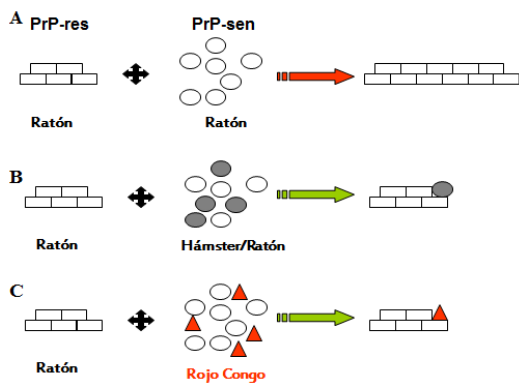
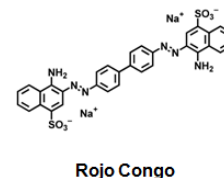


Figura 12. Modelo hipotético de la inhibición de la formación de PrP-res por moléculas PrP-sen heterólogas y polianiones.

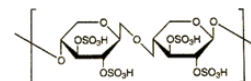
- (A) Incorporación de PrP-sen homóloga en un polímero de PrP-res.
- (B) Interferencia en la incorporación de PrP-sen homóloga por moléculas PrP-sen heterólogas que sí se unen, pero que no se convierten en PrP-res.
- (C) Inhibición de la formación de PrP-res por Rojo Congo y otros polianiones que se unen a PrP-res o PrP-sen.

(Chesebro et al. 1997)

- Compuestos polianiónicos. Los glicanos sulfatados y polioxometalatos (Figura 13) impiden el desarrollo de “scrapie” o son capaces de prolongar la vida de animales infectados con “scrapie” si son administrados antes o poco después de la inoculación del agente TSE. Tanto el Rojo Congo como los glicanos sulfatados se unen a PrP-res y a PrP-sen. Esto sugiere que el mecanismo de acción de estos compuestos se basa en interferir en la interacción entre PrP y los glicosaminoglicanos sulfatados endógenos, que puede ser necesaria para la acumulación de PrP-res.



Rojo Congo



Pentosan polisulfato

Figura 13. Estructura de polianiones que interfieren en la acumulación de PrP-res

- Anticuerpos frente a los priones. Estos estudios se basan en la observación de que anticuerpos frente a la proteína PrP pueden bloquear la replicación de los priones, tanto in vitro como in vivo. Así, ratones que producen anticuerpos frente a PrP o que son inoculados con un anticuerpo monoclonal frente a PrP, no van a desarrollar la enfermedad al ser infectados con priones. Los anticuerpos no atraviesan la barrera hematoencefálica y no llegan al cerebro por lo que el bloqueo solo es efectivo antes de que los priones alcancen el SNC. Uno de los problemas de esta aproximación es que es muy difícil inducir respuesta inmunitaria contra PrP. Esto se debe a que el sistema inmunitario de los mamíferos es muy tolerante a ella, dado que se expresa en la superficie de la mayoría de las células del organismo.
- Anfotericina B y sus análogos: El mecanismo de acción es desconocido, pero estos compuestos retrasan la acumulación de PrP-res y el desarrollo de “scrapie” en roedores. Este tratamiento, para ser efectivo, debe comenzar mucho antes de la aparición de síntomas clínicos. El principal problema de esta aproximación es que la anfotericina B presenta cierta toxicidad, lo que desaconseja un tratamiento incontrolado.

9. Bases moleculares de la patología de las enfermedades priónicas

El síntoma clínico de las enfermedades priónicas es el desarrollo progresivo de problemas neurológicos graves, probablemente debidos a una combinación de patología sináptica y de pérdida neuronal. La pérdida de neuronas es variable y depende tanto de la especie animal como del fondo genético del hospedador y de la cepa del agente infeccioso (cada cepa se localiza en una zona concreta del cerebro, y sus características estructurales condicionarán la neurotoxicidad)

En cuanto a los mecanismos que conducen a la muerte de neuronas, se ha establecido que la apoptosis es uno de los principales. Sin embargo, las vías que conducen a la apoptosis son objeto de intenso debate.

• La proteína PrP^c y su papel en las enfermedades priónicas

Es un dato bien establecido el que los ratones deficientes en PrP (“knockout”) son resistentes al desarrollo del “scrapie” tras la inoculación de PrP-res. Esto coincide con la necesidad de que exista PrP-sen para que pueda ser transformada en PrP-res y se desarrolle la enfermedad. Por tanto, se puede concluir que la proteína PrP^c es esencial para la replicación de los priones.

Hoy en día la función fisiológica de esta proteína no es muy bien conocida. Se le han atribuido varias funciones, como la regulación de la respuesta inmunitaria, transducción de señales, unión a cobre y transmisión sináptica.

PrP-sen se encuentra codificada en el genoma de todos los vertebrados estudiados hasta ahora, y muestra un alto grado de conservación evolutiva, lo que se interpreta como signo de que desempeña una función esencial. Se expresa durante la embriogénesis temprana y se encuentra en la mayoría de los tejidos del adulto. Los mayores niveles de expresión se observan en el sistema nervioso central, en particular en las membranas sinápticas y en los astrocitos. PrP también es muy abundante en células del sistema inmunitario y además se encuentra soluble en varios fluidos corporales como el plasma o la leche.

En varios estudios se ha observado que ratones KO para la proteína PrP^c no desarrollan la enfermedad, y viven aparentemente sin sufrir ninguna alteración. Es decir, no muestran un fenotipo claro que pueda relacionarse con la falta de PrP^c, probablemente debido a mecanismos compensatorios. Se sabe que los genes importantes suelen estar asociados a procesos redundantes, es decir, otras proteínas de vías paralelas pueden rescatar el fenotipo normal tras la eliminación de la PrP^c. Parece poco probable es que una proteína que está conservada entre especies tan diferentes como tortugas, ranas, peces y humanos, haya evolucionado con el único propósito de generar susceptibilidad a las enfermedades priónicas.

Cuando se han analizado con detenimiento los ratones carentes de PrP se ha visto que difieren de los ratones normales en varios aspectos, entre los que están el ritmo cardiaco, la neuroprotección, la función sináptica, la activación linfocitaria, la adhesión celular, la renovación y proliferación de células pluripotentes (“stem cells”) y el olfato. En consecuencia, la PrP parece tener un papel pleiotrópico (interviene en múltiples aspectos celulares) y se postula que podría estar implicada en vías de señalización celular.

- **PrP y neurotoxicidad**

Aún no se sabe cuál es la causa de la muerte celular durante la neurodegeneración provocada por los priones. La pérdida de función de PrP^c no parece ser una causa suficiente, ya que como hemos dicho anteriormente, los ratones deficientes en el gen PrP son prácticamente normales. Sin embargo, la conversión de PrP^c a PrP^{Sc} es claramente clave para la patogénesis dado que los ratones deficientes en PrP son resistentes al desarrollo de la enfermedad y no propagan la infectividad de los priones.

Aunque en estudios in vitro se ha visto que la PrP^{Sc}, e incluso algunos péptidos derivados de la PrP, podrían resultar neurotóxicos, existen varias evidencias experimentales que sugieren que esto no es así in vivo.

Se ha visto que no existe una relación directa entre la cantidad de depósitos PrP^{Sc} y la aparición de síntomas clínicos. Por otro lado, se ha observado que la PrP^{Sc} no resulta tóxica en neuronas que no expresan PrP^c, y que si se detiene la expresión de PrP^c en neuronas una vez que se ha iniciado la infección del cerebro, los ratones no desarrollan la enfermedad clínica, no se produce pérdida de neuronas y se revierten los signos neuropatológicos. Es de destacar que esta reversión tiene lugar a pesar de que la PrP^{Sc} se sigue produciendo en las células gliales, y que estos ratones acumulan niveles de priones similares a los que tienen los ratones control en estados terminales de la enfermedad.

Otro dato interesante es que ratones transgénicos que expresan una variante PrP que carece de la secuencia de anclaje a GPI, producen grandes niveles de una forma soluble. Estos ratones cuando son infectados experimentalmente comienzan a acumular en el cerebro placas de PrP^{Sc}, pero no presentan síntomas clínicos de enfermedad priónica. Además, los cerebros de estos ratones transgénicos presentan formas PrP resistentes a proteasas y resultan infecciosos para ratones normales. Estos datos indican que se requiere que la proteína esté anclada a la membrana por GPI para conferir susceptibilidad a la enfermedad, pero este anclaje no se necesita para la replicación del prión.

Así, todo parece indicar que las neuronas requieren expresar PrP^c y replicar a los priones por sí mismas para que se ejerza la toxicidad.

Como posible explicación, se ha sugerido que la PrP^{Sc} es inerte, y que la toxicidad es debida a una especie minoritaria denominada PrP^L (L “de letal”), que sería generada como un intermediario o producto secundario durante la propagación de los priones.

En la Figura 14 se muestra el proceso propuesto, que acomoda los siguientes dos axiomas:

- i) La PrP^{Sc} actúa como molde para la conversión PrP^c → PrP^{Sc}
- ii) PrP^{Sc} no es un agente tóxico en sí mismo.

El modelo postula que durante la progresión PrP^c a PrP^{Sc} se forma un estado intermediario (PrP^L). El modelo se puede expresar matemáticamente como:

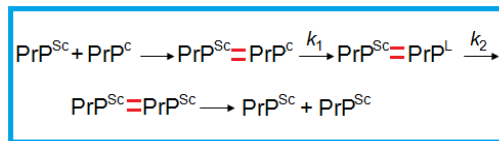
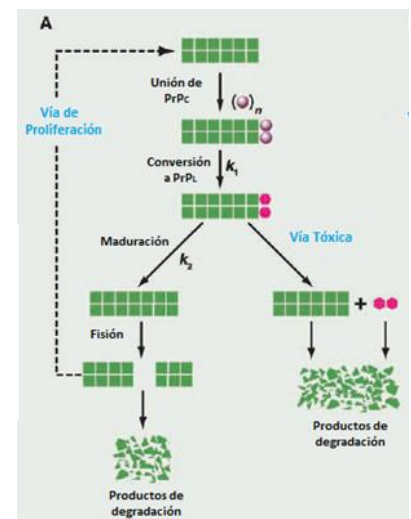


Figura 14. Modelo matemático propuesto para la progresión de PrP^c a PrP^{Sc} y la formación del estado intermediario PrP^L.

De acuerdo con el modelo, PrP^L es la especie tóxica, y la relación de toxicidad e infectividad viene dada por la ratio de velocidad de conversión (k_1) y la velocidad de maduración (k_2). En el caso de una infección subclínica, habría una velocidad relativamente lenta de conversión (k_1) y una alta velocidad de maduración (k_2), lo que significaría unos bajos niveles de PrP^L. Lo contrario ocurriría durante los procesos patológicos, cuya evolución más rápida o lenta vendría dictada por la razón k_1/k_2 (Figura 15).

Figura 15. Modelo ilustrativo para la producción de PrP^L. Intermediario tóxico: este modelo tiene cuatro pasos: unión, conversión inicial, maduración y fisión. Es posible que la PrP^L se disocie antes de ser tóxica, pero esto no es un requisito. El número de moléculas de PrP^c (n) que se unen, transforman y maduran por ciclo no afecta al comportamiento cualitativo del modelo (Figura adaptada de Collinge & Clarke, 2007).



10. Cuestiones por resolver

Aun existen muchas incógnitas sobre los mecanismos patológicos que desencadenan los priones:

- No se conoce cómo se mantienen y transmiten las características de las cepas de priones.
- No se conoce los mecanismos que definen los tropismos de tejido mostrados por las distintas cepas de priones.
- No se sabe cómo los agentes priónicos causan neurotoxicidad.
- Tampoco se sabe por qué los priones no son tóxicos para las células del sistema inmunitario, donde se acumulan en altos niveles.

- Hoy en día la función fisiológica de PrP^c permanece sin resolver. Sin embargo se sabe que la proteína PrP^c está muy conservada en los mamíferos, por lo tanto su función debería ser crucial para la vida.

Es muy posible que los priones hayan aparecido (o evolucionado) como reguladores epigenéticos y no como agentes causantes de enfermedad. Quizás en unos pocos años se descubran muchos procesos celulares que están mediados por proteínas priónicas.

Bibliografía

- **Aguzzi A, Heikenwalder M, and Polymenidou M.** (2007) Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:552-561.
- **Aguzzi, A., and Polymenidou, M.** (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116: 313-327.
- **Brown, P., Brandel, J.P., Sato, T., Nakamura, Y., MacKenzie, J., Will, R.G., Ladogana, A., Pocchiari, M., Leschek, E.W. and Schonberger, L.B.** (2012). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 901-907.
- **Cashman NR, Caughey B.** (2004) Prion diseases - close to effective therapy. *Nat. Rev. Drug Discovery* 3: 874-884.
- **Caughey, B.** (2001) Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem. Sci.* 26: 235-242.
- **Chesebro, B. and Caughey, B.** (1997). Transmissible spongiform encephalopathies (prion protein diseases). In: *Clinical virology* (Eds: D.D. Richman, R.J. Whitley and F.G. Hayden); cap. 54: 1285-1304. Churchill Livingstone Inc., New York.
- **Collinge, J.** (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 519-550.
- **Collinge J, Clarke AR.** (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318: 930-936.
- **Du Plessis DG.** (2008). Prion Protein Disease and Neuropathology of Prion Disease. *Neuroimaging Clinics of North America.* 18: 163-182
- **Gasset, M. y Pajares, M.A.** (2006) Priones. En: *virus patógenos* (L. Carrasco y J.M. Almindral, eds.). Editorial Hélice, Fundación BBVA.
- **Giese, A. and Kretschmar, H.A.** (2001) Prion-induced neuronal damage –the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 253: 203-217.
- **Ironside, J. W., and Head, M. W.** (2004). Neuropathology and molecular biology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 284: 133-159.
- **Lefrère, J.J.** (2007). From mad cows to sensible blood transfusion. The risk of transfusion transmission of the prion through cellular blood products. *Hématologie.* 13: Number 6, 421-43.
- **Silveira, J. R., Caughey, B., and Baron, G. S.** (2004). Prion protein and the molecular features of transmissible spongiform encephalopathy agents. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 284: 1-50.
- **Tuite, M.F., and Serio, T.R.** (2010). The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11: 823-833.
- **Watts, J. C., Balachandran, A. and Westaway, D.** (2006). The expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog.* 2: e26.
- **Weissmann, C.** (2005). Birth of a prion: spontaneous generation revisited. *Cell* 122: 165-168.
- **Wickner, R. B., Edskes, H. K., Ross, E. D., Pierce, M. M., Baxa, U., Brachmann, A., and Shewmaker, F.** (2004). Prion genetics: new rules for a new kind of gene. *Annu. Rev. Genet.* 38: 681-707.

En la red:

- Resource on Prion Diseases, Department of Neurology, Johns Hopkins. <http://www.jhu-prion.org>
- <http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen> [Este sitio contiene imágenes que muestran los cambios conformacionales asociados a la transformación de PrP]