



FACULTAD DE
CIENCIAS

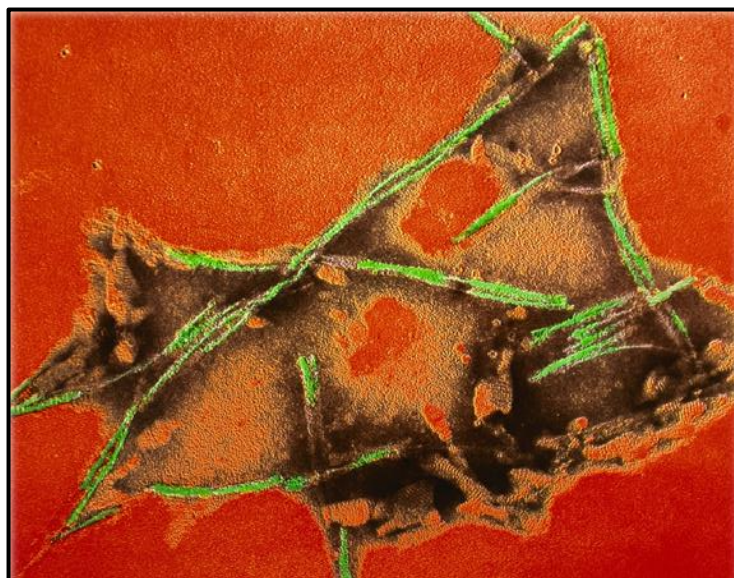
Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
U. A. M. © 2018



TEMA 2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR PRIONES

Encefalopatías Espongiformes Bovinas



Adrián Martínez Bonilla
Sergio Polo Nicoli
Beatriz Queipo López
Jonathan Ruiz García

Curso 2018-2019
Microbiología Clínica 4º Bioquímica

Índice

1. Introducción.....	2
2. Biología del agente infeccioso.....	4
3. La enfermedad en humanos.....	6
3.1 TSE infecciosa.....	6
3.2. TSE familiar	7
3.3 TSE esporádica.....	8
4. Aspectos moleculares de la patogénesis PrP.	10
5. Tropismo de especie y barrera de especies.....	15
6. Cepas, aislados y tipos de priones.	19
7. Una teoría unificadora de cepas y barrera de especie.....	22
8. Aproximaciones al tratamiento de las enfermedades TSE.	24
9. Bases moleculares de la patología de las enfermedades priónicas.....	27
9.1. La proteína PrPc y su papel en las enfermedades priónicas.	27
9.2. PrP y neurotoxicidad.	28
10. Expansión de la proteína priónica en el organismo.....	31
11. Cuestiones por resolver	32
Bibliografía.....	34

1. Introducción

Como vamos a ver en este tema, los priones son proteínas con la capacidad de inducir enfermedades. Además, son infecciosos, lo que supone romper con el paradigma de que la información es portada sólo por los ácidos nucleicos y expresada en forma de proteínas, ya que estas proteínas contienen una información que al ser transmitida a otras proteínas va a ser causa de la enfermedad.

Por otro lado, proteínas priónicas se han identificado en organismos como levaduras y otros hongos donde desempeñan papeles fundamentales. Así, las alteraciones conformacionales, que constituyen los priones, son autorreplicantes y pueden ser transferidas 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 unos sistemas epigenéticos que han evolucionado en base a que pueden modificar de una forma rápida un fenotipo celular en respuesta a un cambio ambiental sin necesidad de introducir cambios en la secuencia o función del genoma.

Actualmente, se define como prión a toda proteína codificada en el genoma que ha experimentado un cambio 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 anomalía biológica, que en mamíferos es causa de enfermedades, sino que probablemente son piezas importantes de los mecanismos reguladores.

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE, “Transmissible Spongiform Encephalopathies”) o enfermedades priónicas son un grupo inusual de enfermedades degenerativas del cerebro que son transmitidas 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.

Todas estas enfermedades son causadas por agentes infecciosos distintos a los habituales: virus, bacterias o parásitos. Son causadas por la proteína priónica PrP (“prion protein”), codificada por el gen PRNP. El término “prión” fue acuñado en 1982 por Stanley Prusiner para referirse al agente causante de las enfermedades TSE, y deriva de la frase en inglés “proteinaceous infectious particle”.

Los priones 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 SNC.

La demencia y la ataxia cerebelar son los síntomas clínicos más habituales, en la mayoría de los casos conduce a la muerte del individuo infectado en meses o años. La patología ocurre principalmente en el S.N.C. y consiste en una astrocitosis severa, acompañada de una vacuolización y pérdida de neuronas, lo que da un aspecto espongiiforme al tejido afectado. Además, con frecuencia, se observan fibras o placas amieloides.

No se observan procesos inflamatorios celulares, ni respuestas inmunológicas celulares o humorales, como ocurre cuando se producen infecciones por el resto de agentes infecciosos (virus, bacterias y parásitos).

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, 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 espongiiforme bovina (BSE, “bovine spongiform encephalopathy”), 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 fueron registrados en el Reino Unido, aunque el número total de animales infectados se estimó 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. Se estimó que unas 200 personas murieron, la mayoría en Reino Unido, por una nueva forma de TSE conocida como variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, “variant Creutzfeldt-Jakob disease”). Existen datos experimentales que demuestran 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. Estas prácticas dejaron de hacerse a finales de los años 50.

2. Biología del agente infeccioso

Mediante experimentos de ultrafiltración se demostró que el agente TSE tenía un tamaño entre 20 y 100 nm, un tamaño parecido al de algunos virus convencionales. Sin embargo, el empleo de técnicas de ultracentrifugación ha puesto de manifiesto una gran heterogeneidad en tamaño. Además, un problema para la caracterización es que resulta 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 vio que los agentes TSE eran mucho más resistentes que los virus frente a tratamientos químicos, tales como el formaldehído, el alcohol o el amoníaco. Además, son resistentes al calentamiento hasta ebullición o mediante autoclavado convencional. De hecho, una forma de propagación de TSE entre pacientes ha sido por una incompleta inactivación con formaldehído del material

quirúrgico. Entre los métodos probados, el tratamiento del material con NaOH 1N y su posterior autoclavado a 121°C durante 1 hora se ha mostrado eficaz en la inactivación de los priones.

Análisis bioquímicos sobre extractos de cerebro con “scrapie”, enriquecidos con el agente infeccioso, condujeron al descubrimiento de una proteína resistente a proteasas, nombrada como PrP o proteína prión, como el agente infeccioso causante del “scrapie”. Esta proteína es el principal componente de las fibras observadas en los cerebros con “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 similares niveles tanto en animales normales como 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.

La PrP-res se detecta mediante “Western-blot” en extractos de cerebros de todas las enfermedades TSE en todos los animales susceptibles, y este es el mejor método de diagnóstico de estas enfermedades. Como se muestra en la figura 1, tras el tratamiento con proteinasa K de extractos de tejidos de animales sospechosos, en los casos que se sigan detectando bandas con los anticuerpos anti-PrP se puede concluir que el animal está infectado.

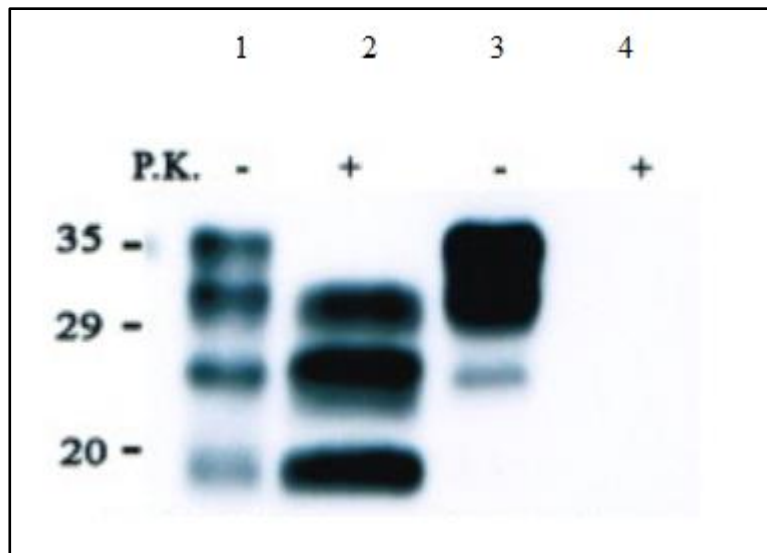


Figura 1. Detección de PrP-res por Western blot como método diagnóstico de la enfermedad priónica. Carriles 1 y 3: controles negativos, sin tratar con proteinasa K. Carriles 2 y 4: tratamiento con proteinasa K. Carril 2: PrP-res. Carril 4: PrP-sen. [Imagen obtenida de Agazzi & Polymenidou (2004)]

3. La enfermedad en humanos

Se trata de desórdenes neurodegenerativos raros, con una incidencia mundial de 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 TSE se subdividen 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.

3.1 TSE infecciosa

Este grupo infeccioso lo componen el kuru, la TSE iatrogénica y la vCJD. En todos los casos está claro que los pacientes han estado expuestos al agente TSE a través del contacto con tejidos cerebrales o material contaminado con el agente TSE. Este grupo supone el 2-5% de todas las enfermedades priónicas. Casos de TSE iatrogénica se han inducido por trasplante de córnea de pacientes con TSE o por neurocirugía, a través de la utilización de instrumentos incompletamente esterilizados que con anterioridad se habían empleado con pacientes TSE. Estudios han demostrado que los priones se adhieren con mucha facilidad a las superficies metálicas. También se han reportado 226 casos en personas a las que se les había inoculado la hormona de crecimiento preparada a partir de

glándulas pituitarias procedentes de cadáveres, entre los que previsiblemente se encontraba algún paciente TSE no diagnosticado. También se han descrito 228 casos en personas que han recibido transplantes de duramadre (procedentes de cadáveres con enfermedad CJD no diagnosticada).

Existen evidencias que relacionan la BSE y la vCJD. Las neuropatológicas asociadas a esta enfermedad muestran características distintivas del resto de enfermedades priónicas en humanos. Un hecho que llama la atención es que en todos los casos de vCJD han ocurrido con personas que eran homocigotos para metionina en la posición 129 de la proteína priónica (determinado por la secuencia del gen), como se muestra en la tabla 1.

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

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

Hasta ahora, se han descrito cuatro casos de vCJD, cuya transmisión parece haber ocurrido como consecuencia de transfusión sanguínea. Estos datos indican que los priones BSE podrían recircularizar entre humanos.

3.2. TSE familiar

Esta enfermedad está asociada 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; hasta ahora se han descrito unas 40 mutaciones diferentes en el gen PrP asociadas a enfermedad. Estas enfermedades suelen desarrollarse en la edad media de una persona, y suponen alrededor del 10-15% de las enfermedades priónicas. Estas enfermedades se denominan CJD familiar o GSS familiar dependiendo de si la característica clínica principal es demencia (CJD) o ataxia cerebelar (GSS). También a este grupo de enfermedades pertenece la enfermedad del insomnio fatal (FFI, “fatal familiar insomnia”). Sin embargo, todavía no se ha podido explicar cuáles son las causas de estas diferencias en patología, aunque parece estar relacionada con la distribución de PrP-res en el cerebro.

3.3 TSE esporádica

La más frecuente dentro de este grupo es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (sCJD) esporádica. Esta enfermedad ocurre con una incidencia mundial de 1 persona por cada millón de población y por año, supone el 85% de las enfermedades priónicas. En este grupo no se ha detectado una asociación tan clara como en vCJD con alelos PrP mutantes (ver Tabla 1) aunque sí se ha establecido una correlación (ver tabla 2), ni tampoco que los pacientes hayan estado expuestos al agente TSE a través del contacto con personas o animales con TSE. La hipótesis actual es una mutación somática sobre PrP o a través de un proceso estocástico que desencadena la formación espontánea de PrP-res sin una mutación PrP. Además de la relación con polimorfismos en el gen PRNP, se ha establecido una correlación, aún por confirmar de forma definitiva, con polimorfismos en los genes PLCXD3, MTMR7 y el gen de la catepsina D.

Subtipo	Frecuencia (%)	Síntomas neurológicos	Ubicación de PrP
MM1	57	Cambio espongiforme y aparición de microvacuolas en cerebro y cerebelo.	Granular, sináptica.
MV1	6		
MM2 cortical	7	Cambio espongiforme en corteza cerebral.	Perivacuolar
MM2 talámica	<1	Pérdida de neuronas en tálamo, cambio espongiforme limitado. Fenotipo similar a FFI, por lo que se denomina “insomnio fatal esporádico”.	Granular, sináptica.
VV1	2	Cambio espongiforme y microvacuolas en lóbulo temporal.	Sináptica.
VV2	14	Pérdida neuronal y gliosis en cerebelo, cambio espongiforme en la capa III de la corteza cerebral.	Perineuronal, sináptica; forma placas.
MV2	14	Placas similares a las de Kuru en corteza cerebral, aparición de microvacuolas y cambio espongiforme.	Sináptica; forma placas.

Tabla 2. Subtipo de sCJD en función del genotipo del codón 129 del gen PRNP. [Adaptada de Ritchie & Ironside (2017)]

Recientemente se ha descrito otra enfermedad priónica esporádica, la VPSPr (Variably protease-sensitive prionopathy), todavía de causa desconocida y por tanto sin criterio de diagnóstico establecido. Los pacientes suelen ser de edad avanzada, y sufren varias afecciones; entre ellas, alteraciones motoras y neurológicas, ataxia y deterioro cognitivo. La enfermedad se desarrolla durante un tiempo más largo que la sCJD. Como ya se ha comentado es difícil de diagnosticar y por ello muchos casos se han identificado tras la autopsia del paciente, por lo que se piensa que realmente las estadísticas podrían subestimar la frecuencia con la que se da la enfermedad.

VPSPr ha podido identificarse al examinar PrP-res de cerebro por Western blot. Al contrario que en sCJD, en la cual el polimorfismo predominante del codón 129 es MM, en esta enfermedad es más frecuente el genotipo 129VV, siendo MM el menos frecuente. La enfermedad se caracteriza por cambio a morfología espongiiforme, aparición de vacuolas de un tamaño intermedio y placas amiloides en el cerebelo, a diferencia de sCJD, donde estos cambios se dan mayormente en el cerebro. Además, PrPSc es relativamente menos resistente a la digestión por proteinasa K, resultando en un patrón de bandas característico con una banda de 8 kDa.

Existe una relación entre el tipo de enfermedad (y sus síntomas) y el lugar del cerebro donde se observa la acumulación de proteínas priónicas (figura 2).

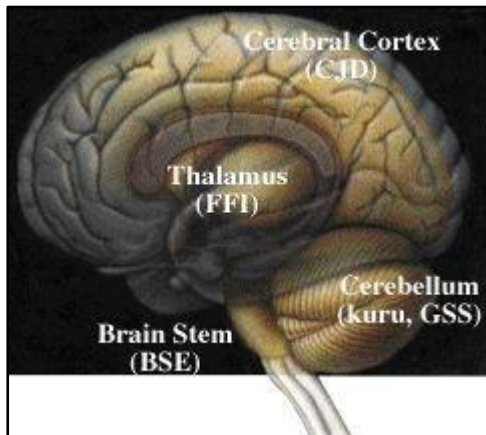


Figura 2. Localización de PrP en el cerebro y síntomas clínicos.

Corteza: pérdida de memoria y agudeza mental, también dificultad visual (CJD).

Tálamo: "Fatal familial insomnia" y subtipo MM2 talámica de sCJD.

Cerebelo: pérdida del control de los movimientos y dificultad para caminar (Kuru, GSS, VPSPr, algunos subtipos de sCJD).

Tallo: lugar donde preferentemente se localizan los priones en la enfermedad variante CJ (relacionada con BSE). Múltiples síntomas: desgana, dificultad para memorizar, pérdida de control sobre el movimiento muscular, problemas de habla.

4. Aspectos moleculares de la patogénesis PrP.

Como se indicó antes, la PrP-res parece desempeñar un papel central en las enfermedades TSE, por lo que es importante entender en qué difieren la PrP-res y la PrP-sen normal y qué es lo que conduce a la formación de PrP-res. Hay que recordar que tanto la forma normal como la anormal son codificadas por el mismo gen. Así, parece que las diferencias entre PrP-res y PrP-sen pueden ser conformacionales o, además, debidas a interacciones con cofactores. De hecho, análisis conformacionales han mostrado evidencias de que la PrP-res tiene mayor contenido en estructura secundaria de hoja-beta que la PrP-sen (figura 3). En cambio, PrP-sen tiene un alto contenido en α -hélice. Sin embargo, la proteína es estructuralmente polidispersa, y de ahí la dificultad en cristalizarla.

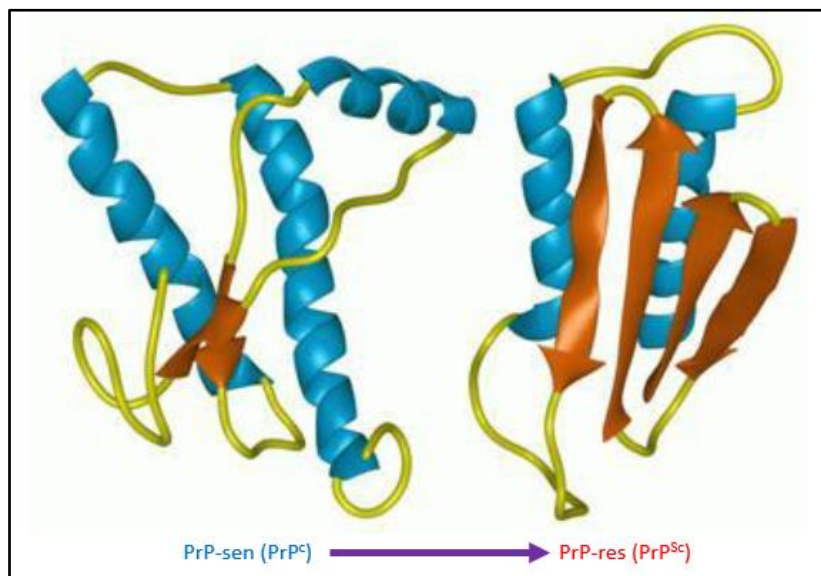


Figura 3. Cambio conformacional de la proteína PrP. La proteína PrP celular (PrP-sen), que presenta mayor contenido en α -hélice, pasa a PrP patológica (PrP-res), que presenta mayor contenido en hoja β .

La PrP es sintetizada inicialmente como un polipéptido de 253 aminoácidos (figura 4). Sin embargo, un péptido señal N-terminal de 22 aminoácidos es retirado durante la biosíntesis y otros 23 aminoácidos son retirados del extremo C-terminal durante la adición de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Así, la PrP madura consta de 209 aminoácidos. En el extremo N-terminal existen cuatro repeticiones del octapéptido PHGGGWGQ, cada una de estas repeticiones interacciona con un átomo de Cu(II) u otros cationes divalentes, lo que ha llevado a sugerir un papel de la proteína en la defensa frente al daño oxidativo.

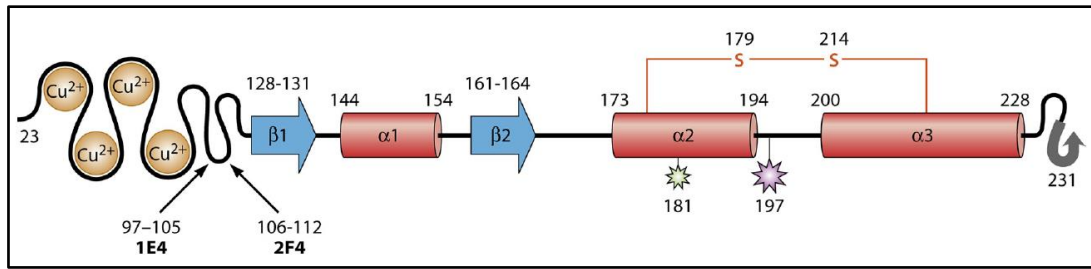


Figura 4. Estructura de PrP^C humana. Estructura obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN) donde se muestra la estructura, las modificaciones postraduccionales y los epítipos de los anticuerpos anti-PrP. La PrP humana madura contiene 209 aminoácidos. Presenta un dominio N-terminal flexible que contiene cuatro octapéptidos de unión a cobre repetidos y un dominio C-terminal plegado que presenta dos láminas- β y tres α -hélices. Las cisteínas en las posiciones 179 y 214 forman un puente disulfuro entre los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Los residuos en posiciones 181 y 197 pueden ser glicosilados y el anclaje GPI está unido al residuo 231. Los epítipos de los anticuerpos anti-PrP 1E4 y 3F4 se localizan en los residuos 97-105 y 106-112 respectivamente. [Imagen obtenida de Das & Zou (2016)]

La PrP, como una típica glicoproteína de membrana plasmática, comienza su ciclo metabólico en el retículo endoplasmático (RE), donde sufre glicosilación de restos de manosa (la proteína tiene dos sitios posibles de glicosilación, N-181 y N-197), la formación de un puente disulfuro entre los residuos C-179 y C-214, y adquiere el anclaje GPI (figura 5). En el aparato de Golgi continúa el proceso de glicosilación, y finalmente es transportada a la membrana plasmática (figura 5). Se observa también cierta recirculación entre la superficie celular y vesículas endocíticas. La vida media de la proteína sobre la membrana se estima en unas 3-6 horas. La proteína puede ser retirada de la membrana con tratamientos con fosfolipasa o proteasas.

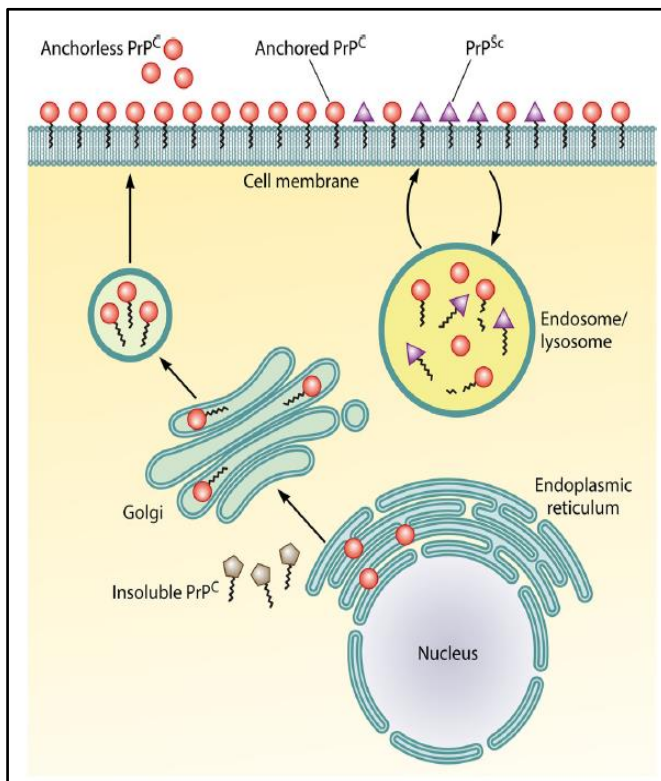


Figura 5. Biosíntesis, tráfico y conversión de PrP celular. PrP^C es sintetizado y modificado postraduccionalmente en el retículo endoplásmico (RE). De ahí es transportado a la membrana celular tras sufrir más modificaciones en el Golgi. En el RE la proteína sufre la proteólisis de los péptidos señal del N y C-terminal, seguido de la adición en el N-terminal de residuos glucídicos así como un anclaje tipo GPI. Finalmente, se forma un único puente disulfuro. Tras llegar a la membrana celular, algunos PrP^C son internalizados en endosomas, aunque la mayoría acaban siendo reciclados de vuelta a la membrana. Un número limitado de PrP endocitados son proteolizados en el residuo 110. El PrP anclado en la membrana puede ser liberado al espacio extracelular por la proteólisis del anclaje tipo GPI. La conversión de PrP^C a PrP^{Sc} ocurre tanto en la membrana celular como en los endosomas o lisosomas. Se han observado acumulaciones de PrP^C insoluble alrededor del núcleo. [Imagen obtenida de Das & Zou (2016)]

Al contrario de lo que ocurre con la PrP normal, la PrP-res sobre las células infectadas con “scrapie” es resistente a los tratamientos con fosfolipasa y proteasas (proteínasa K). Además, la PrP-res presenta un recambio hacia el interior de las células muy bajo, lo que explica su acumulación *in vivo*. La conversión de PrP al estado de resistencia a proteasas ocurre probablemente en la membrana plasmática o a lo largo de vías endocíticas hacia los lisosomas (figura 5). El proceso de transformación requiere una desnaturalización parcial de PrP-sen que es favorecida en medio ácido. Una vez formada, PrP-res se acumula en lisosomas secundarios, sobre la superficie celular o en espacios extracelulares en la forma de depósitos amorfos, fibrillas o placas amieloides densas. En la figura 6 se muestra un modelo hipotético de cómo estarían estructuradas las fibras de proteína PrP-res.

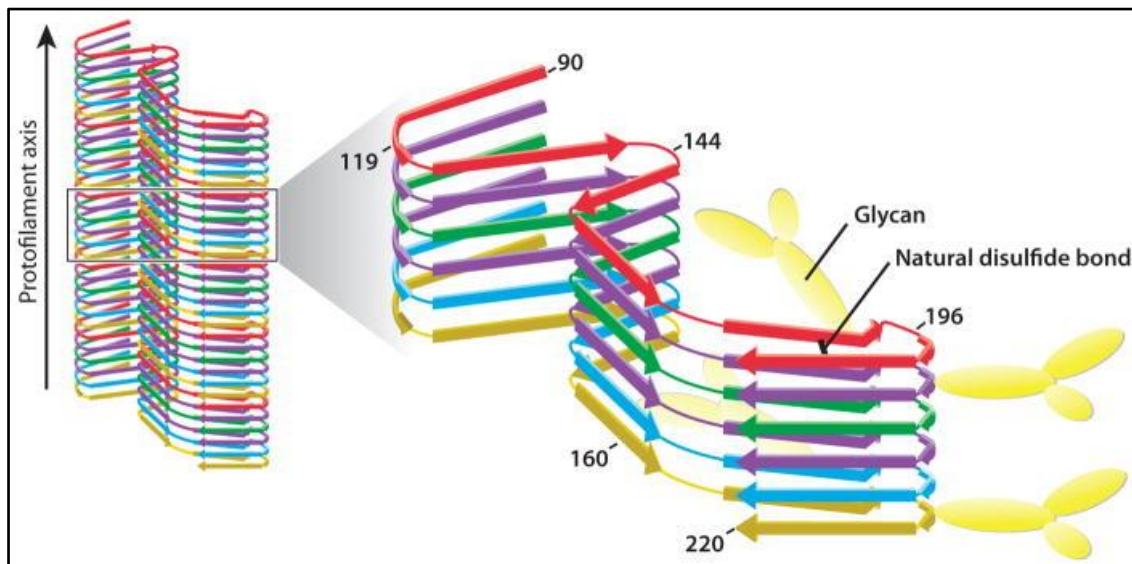


Figura 6. Modelo de la estructura de PrP^{sc}. Los monómeros de PrP^{sc} se alinean a lo largo del eje del protofibrilamento dando lugar a apilamientos de láminas β . Cada cadena coloreada representa un monómero de PrP. Las flechas representan láminas β y las líneas α hélices y giros. [Imagen obtenida de Kraus et al. (2013)]

Cómo se forma la PrP-res ha sido motivo de discusión durante mucho tiempo. La hipótesis más aceptada es que la propia PrP-res instiga la formación de nuevas PrP-res a través de una interacción directa con la PrP-sen endógena convirtiéndola en forma responsable de la enfermedad TSE. Una evidencia directa de este mecanismo ha sido obtenida en sistemas libres de células en los que se ha demostrado que la PrP-sen puede ser convertida en la forma resistente a proteasas en la presencia de PrP-res aislada de tejido de cerebro infectado con “scrapie”. En concreto, se ha visto que la incubación de PrP^c radiactiva con PrP-res no marcada en un sistema libre de células genera PrP-res radiactiva. Además, este tipo de experimentos han servido para explicar el fenómeno de barrera de especies. Así, se vio que la PrP-res de hámster fue incapaz de convertir a la

PrP-sen de ratón en la forma resistente a proteasas, mientras que la PrP-res de ratón convirtió de forma parcial a 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.

Posteriormente, se desarrolló 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, puede entenderse como una demostración del modo de propagación de los priones. En la figura 7 se ilustra el método. Pequeñas cantidades de material infectado son mezcladas con un homogenizado de cerebro normal. La conversión in vitro, teóricamente hostigada por la PrP-res, se deja que ocurra a 37°C. Transcurrido el periodo de incubación, la mezcla es sonicada, y esta etapa resulta crítica. Aquí, la fuerza mecánica se utiliza para romper los agregados de PrP-res formados en estructuras más pequeñas, que a su vez actuarían de nuevos puntos de nucleación para la formación de más PrP-res. De este modo, varios ciclos de conversión y sonicación se llevan a cabo para “amplificar” la cantidad de PrP-res presente en la muestra. Sin embargo, la producción de nueva PrP-res resulta modesta si se omite la etapa de sonicación.

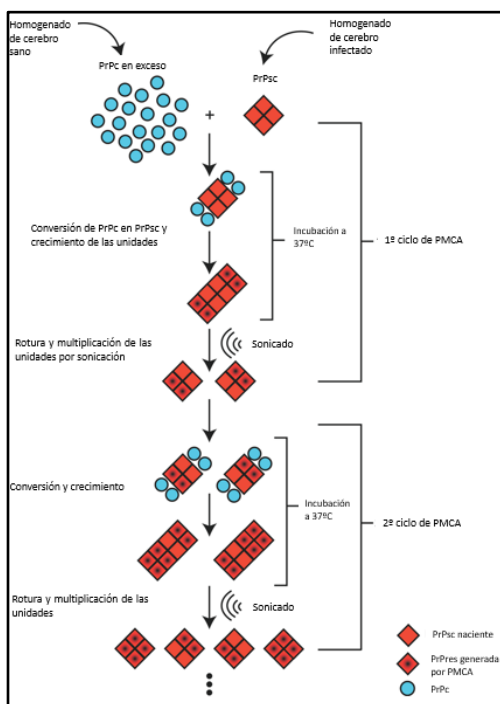


Figura 7. Representación esquemática del procedimiento de PMCA. Homogenado de cerebro de un animal infectado (que contiene PrP^{sc}) se mezcla con homogenado de un animal sano (que contiene PrP^c) y se incuba la mezcla a 37°C. En esta etapa, algunas moléculas de PrP^c se convierten en PrP^{sc} y se unen a la unidad de PrP^{sc} en crecimiento. La sonicación rompe PrP^{sc} en unidades más pequeñas, generando nuevas unidades para la conversión. [Imagen obtenida de Watts et al. (2006)]

Más recientemente se han realizado tres modificaciones de la metodología PMCA que han aumentado su eficiencia. Primero, la técnica se ha automatizado, pues el proceso requiere de varios días para completarse. Una segunda modificación ha sido la inclusión de bolitas de Teflon, que acelera la conversión a PrP-res, incrementando la sensibilidad de la técnica. Y la tercera modificación es que ha sido posible realizar la amplificación de PrP-res de hámster en presencia de PrP recombinante (rPrP) de hámster en lugar de utilizar tejido de cerebro como sustrato.

Estas modificaciones han dado lugar a una metodología denominada rPrP-PMCA. Esta metodología requiere menos tiempo, solo 2-3 días para obtener los resultados, mientras que el PMCA tradicional requiere de hasta 16 días. No obstante, rPrP-PMCA es menos sensible, pudiendo detectar hasta 50 ag (50 attogramos = 5×10^{-17} g), mientras que PMCA puede detectar hasta 0.1 ag (10^{-19} g)

En relación con este último punto, cabe indicar que la técnica PMCA ha permitido detectar PrP-res en sangre de forma temprana tras la infección de hámsters con muestras de scrapie. Esto ha abierto la esperanza que algún día sea posible aplicar esta metodología para el diagnóstico precoz de enfermedades TSE en humanos.

Una técnica similar al PMCA es el S-QuIC (*Standard Quaking Induced Conversion*). En ella se lleva a cabo la amplificación de PrP-res utilizando rPrP, al igual que en rPrP-PMCA, con la diferencia de que en S-QuIC se someten las muestras a agitación en lugar de sonicarlas, ya que la agitación es más fácil de controlar y de reproducir.

La técnica ASA (“Amyloid Seeding Assay”) es otra técnica de detección de priones, que fue descrita en 2007 para la detección de priones en cerebros de pacientes con CJD. En esta técnica se parte de una preparación de priones, parcialmente purificada, y se mezcla con PrP recombinante, producida en bacterias. La formación de fibras se detecta mediante el cambio de fluorescencia (de 342/430 a 442/482) que experimenta la tioflavina T (ThT) al interaccionar con la fibra amiloide. Aunque la sensibilidad del ensayo depende de la cepa del prion, la técnica puede llegar a detectar tan solo 1 fg. Además, es más rápida que la técnica PMCA, se puede completar en un día, y no es dependiente de sonicación.

No obstante, estas técnicas tienen ciertas limitaciones prácticas. rPrP-PMCA requiere la sonicación de las muestras, lo que puede ser difícil de controlar, y no es un buen método para procesar un gran número de muestras dado que deben llevarse a cabo en tubos separados para su posterior detección por inmunoblot. En lo que respecta a ASA,

tiene la ventaja de que se lleva a cabo en una placa multipocillo, permitiendo procesar varias muestras simultáneamente, pero es frecuente que ThT dé reacciones positivas en el control negativo por fibrilación espontánea.

Para solucionar estas limitaciones, se ha desarrollado una nueva metodología, el RT-QuIC (*Real Time Quaking Induced Conversion*). Esta técnica combina el estudio de la fluorescencia de ThT en placas multipocillo con las condiciones del S-QuIC, que disminuyen los falsos positivos del ThT.

En esta técnica, se toma líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente que se sospecha que padece CJD y se añade a una mezcla que contiene rPrP y ThT. Si hay PrP^{Sc} presente en el LCR, se unirá al rPrP e induce su cambio conformacional dando lugar a fibras. Este proceso puede durar hasta 30 horas y se conoce como fase de lag, tras la cual las fibras comienzan a agregar y unen ThT, que empieza a emitir fluorescencia. Esta fluorescencia se monitoriza a tiempo real.

Inicialmente se utilizaba la secuencia entera de rPrP de hámster o de rPrP de humano y se requerían hasta 90 h para completar el proceso. En la detección de sCJD tenían una sensibilidad del 69-89% y una especificidad del 99%. Posteriormente se desarrolló el RT-QuIC de segunda generación que utiliza como sustrato formas truncadas de rPrP de hámster y que tiene un tiempo de análisis menor, unas 30 h. Esta tiene una sensibilidad y especificidad del mismo orden que la primera.

En la tabla 3 se resumen las principales características de estas técnicas.

Técnica	Principio	Sensibilidad (PrP ^{res})	Tiempo de ensayo	Comentarios
PMCA	Conversión de PrP ^c de cerebro, sonicación, Western blot	0.1 ag	16 d	Dificultad para estandarizar la sonicación
rPrP-PMCA	Conversión de PrP ^c recombinante, sonicación, Western blot	50 ag	2-3 d	Dificultad para estandarizar la sonicación
ASA	Conversión de PrP ^c recombinante, agitación, detección de ThT en placa multipocillo	1 fg	1 d	Ocurre fibrilación espontánea
S-QuIC	Conversión de PrP ^c recombinante, agitación, Western blot	0.1-100 fg	1-3 d	Fibrilación espontánea minimizada
RT-QuIC	Conversión de PrP ^c recombinante, agitación, detección de ThT en placa multipocillo	1 fg	2 d	Fibrilación espontánea minimizada. Apto para el diagnóstico de CJD

Tabla 3. Características principales de las técnicas de detección de priones. [Información obtenida de Haley et al. (2018)]

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).

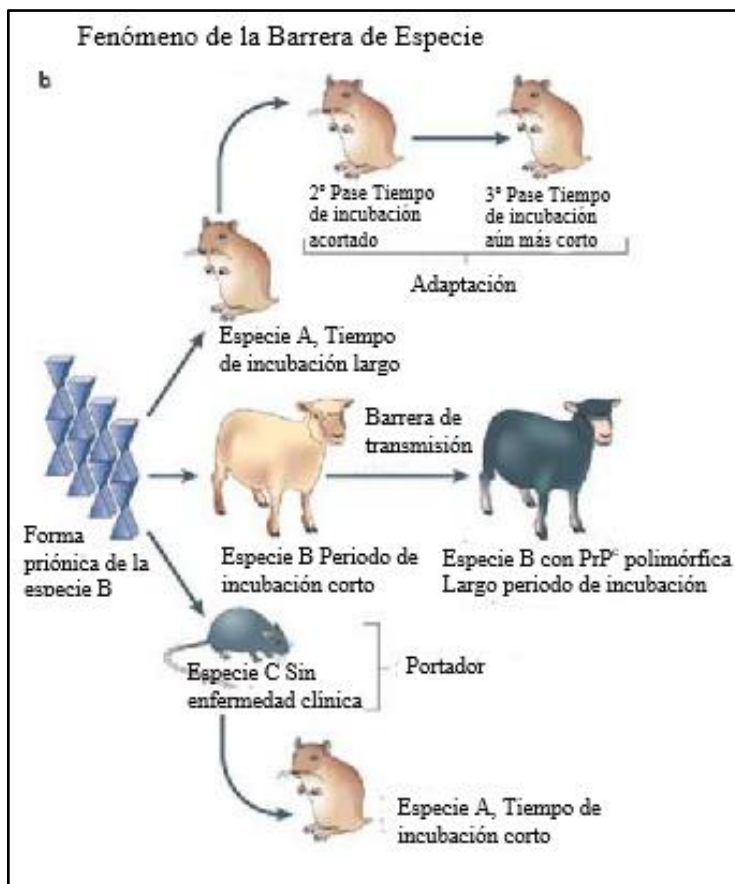


Figura 8. Fenómeno de la barrera de especie. Los priones aislados de una especie suelen ser menos infecciosos en otras especies, lo que se observa en los largos periodos de incubación y los síntomas más leves en otras especies. Esto se piensa que se debe a diferencias en la proteína priónica del hospedador, lo que dificultaría el proceso de conversión. Tras una serie de pases, el tiempo de incubación decrece gradualmente, fenómeno conocido como adaptación. En algunos casos, la barrera de especie es tan fuerte que algunos hospedadores no muestran síntomas clínicos de la enfermedad cuando son inoculados con priones de otras especies. Sin embargo, aislados de cerebro de estos hospedadores resistentes transmiten la enfermedad cuando son inoculados en hospedadores susceptibles. Los hospedadores de la misma especie pueden mostrar distintos tiempos de incubación para un mismo inóculo de prion por polimorfismos en la proteína priónica de cada uno, fenómeno conocido como barrera de transmisión. [Imagen obtenida de Aguzzi et al. (2007)]

Cuando se inoculan priones de una especie A a una especie B, normalmente sólo unos pocos animales de la especie B desarrollan 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 B con priones procedentes de individuos de la especie B, 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 prion 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”.

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.

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. 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” (figura 8).

No obstante, 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”.

Estos componentes presentes en el donante sugieren que podrían ser cofactores y/o una composición glucídica determinada de PrP^{Sc}. En estudios recientes, se ha visto que los lípidos están involucrados en el mantenimiento de la conformación específica del prion y de sus características específicas de cepa. Si la barrera de especie se puede atribuir en ciertas condiciones a cambios en cofactores o a componentes determinados del interior celular, se podría hablar de una “barrera de cofactor”.

Finalmente, cabe mencionar que dos cepas de priones (ver el apartado siguiente), 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 (pero no los priones

de la forma variante, como se indicó arriba) son altamente infecciosos en ratones transgénicos para la PrP^C humana. Este fenómeno se le conoce como “barrera de cepa”.

Con respecto a la capacidad de adaptación de los priones que les permiten superar estas barreras, existen dos hipótesis (figura 9):

La hipótesis de la “nube” sugiere que un conjunto de priones pertenecientes a una misma cepa es intrínsecamente heterogéneo. Esta heterogeneidad surgiría de variaciones espontáneas en la estructura de PrP^{SC}. Cuando se produce la transmisión entre especies, habrá variantes minoritarias de PrP^{SC} que serán más compatibles con la secuencia primaria del PrP^C del hospedador.

La hipótesis del moldeado deformable postula que cambios en el ambiente de replicación de los priones, como el que se produce en la transmisión entre especies, generan la aparición de nuevas variantes de PrP^{SC}. Es decir, en situaciones en las que el PrP^{SC} del donante no es compatible con el nuevo ambiente de replicación o con la secuencia primaria del hospedador, se genera un nuevo rango de variantes de PrP^{SC}. La mayoría de los nuevos no serán capaces de continuar la replicación, pero puede aparecer una variante que sea compatible con el ambiente o la secuencia del PrP^C del hospedador.

Estas dos hipótesis no son excluyentes. El moldeado deformable proporciona un mecanismo por el que los miembros de la “nube” podrían sufrir cambios conformacionales en un nuevo ambiente dando lugar a una nueva “nube”.

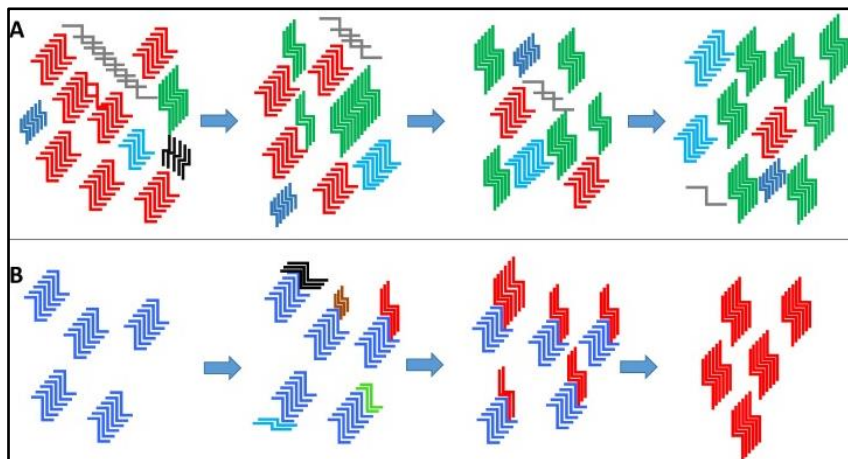


Figura 9. A → la hipótesis de la “nube” sugiere que una población de un mismo prion está formada por una mezcla heterogénea de variantes de PrP^{SC} donde hay una conformación dominante (la roja) y poblaciones minoritarias (los demás colores). Un cambio en el ambiente de replicación puede hacer que se seleccionen las variantes minoritarias y pasen a ser las dominantes (la verde). B → la hipótesis del moldeado deformable propone que se crean nuevas variantes estructurales de PrP^{SC} a partir de la conformación dominante (la azul) debido al nuevo ambiente de replicación. Estas variantes se generan por una serie de eventos de prueba y error hasta que uno encaja con el nuevo ambiente de replicación y se convierte en la nueva conformación dominante (la roja) reemplazando a la original (azul). [Imagen obtenida de Aguzzi, & Polymenidou (2004)]

6. Cepas, aislados y tipos de priones.

Un hecho remarcable es la existencia de “cepas de priones” dentro de una misma especie animal, que se diferencian en el tiempo de incubación que necesitan para desarrollar enfermedad, las características histopatológicas de las lesiones, los blancos neuronales específicos y la capacidad para atravesar la barrera de especie. Es decir, una misma proteína priónica puede adoptar varias conformaciones auto-replicas, a éstas se les denomina cepas de priones, y se especula que van a ser sus propiedades físico-químicas las que van a ser responsables de su ensamblaje en agregados, y éstos, a su vez, responsables de los fenotipos específicos de cada tipo de enfermedad.

Como se comentó antes, la proteína PrP tiene dos sitios de N-glicosilación (Asn181IleThr y Asn197PheThr), por lo que la proteína se puede encontrar en cuatro glicoformas: diglicosilada, dos formas monoglicosiladas (según el sitio de glicosilación) y una forma no glicosilada (figura 10). Además, existe una gran microheterogeneidad según las estructuras oligosacáridas presentes. En general, la glicosilación promueve la estabilización de las proteínas, y esto también parece ocurrir en el caso de la proteína PrP, ya que en la fracción en la forma PrPSc (no digerida por proteasas) las formas glicosiladas son minoritarias, y, de hecho, la forma diglicosilada no suele estar presente en la fracción resistente a proteasas. Además, cuando se inhibe la glicosilación, se observa una aceleración en la formación de la proteína priónica.

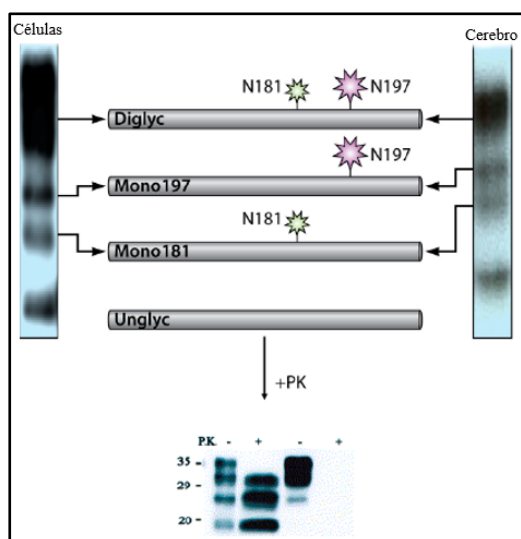


Figura 10. Esquema Glicosilación y transformación priónica Esquema de los puntos de glicosilación de la PrPC y cómo este proceso protege de la conversión a PrPSc, de proteínas obtenida de células que expresan el prion o muestras de tejido cerebral infectado. Las formas Mono 197 y Unglyc muestra varias bandas, tras el tratamiento con proteasas, es decir se han vuelto resistentes al mismo. [Modificada a partir de figura en Das & Zou (2016)]

La digestión de PrP-res con proteinasa K (PK) produce una rotura entre los residuos 87 y 91 (dependiendo de la cepa del prión). Una vez analizado por Western-blot se observan tres bandas que corresponden a las formas di-, mono- o no-glicosiladas (figura 10). Las diferentes cepas de priones se suelen diferenciar en algunas propiedades físicas como son susceptibilidad a la digestión con PK, movilidad electroforética después del tratamiento con PK que refleja el sitio de corte en la región N-terminal, la relación entre formas di-, mono- o no-glicosiladas, y su estabilidad frente a agentes desnaturalizantes.

Así, un ejemplo de cepa de prion infecciosa y promiscua lo constituye la cepa causante de BSE (“bovine spongiform encephalopathy” o “mad cow disease”). Esta cepa es capaz de transmitirse eficientemente entre un rango amplio de especies animales. Además, lo que resulta especialmente significativo, es que es capaz de mantener sus características biológicas en su paso a través de especies intermedias con PrP con distinta estructura primaria (figuras 11 y 12A).

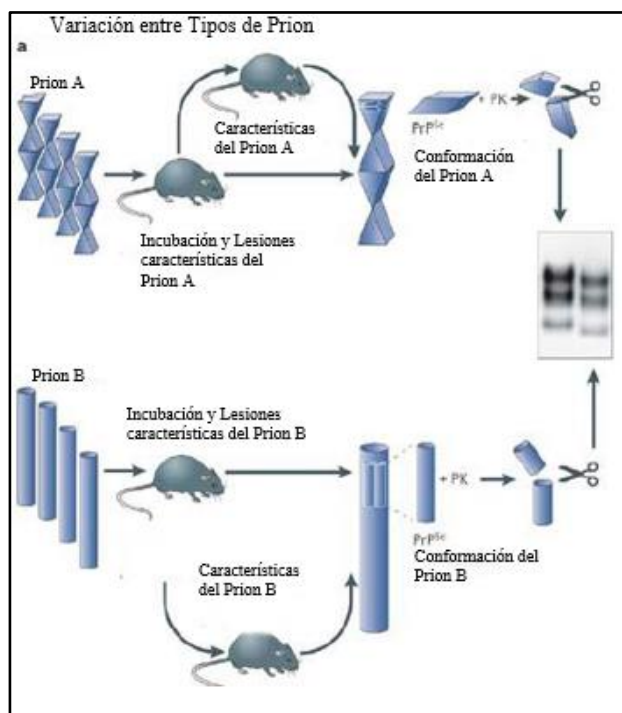


Figura 11. Modelos de variación en Priones y Barrera de especies

A) La inoculación de diferentes tipos de priones (A o B) a sujetos genéticamente idénticos lleva a la aparición de fenotipos diferentes. Las diferencias se mantienen incluso cuando el inóculo se introduce en varios hospedadores. Algunas veces estas características se aprecian en su desplazamiento electroforético tras el tratamiento con proteasas debido a que diferentes sitios de corte son expuestos por los diferentes priones. [Imagen obtenida de Aguzzi et al. (2007)]

Existe una gran variedad de cepas de priones que se han aislado y son propagadas en ratones, donde mantienen sus características de periodos de incubación y neuropatología. Estas cepas no son codificadas por diferentes PrP, ya que la secuencia primaria de los ratones es idéntica, ya que sólo existe un gen (figura 11). Además, como se indicó antes

(figura 8), las cepas pueden aislarse de nuevo en ratones, después de haberse propagado en distintas especies animales.

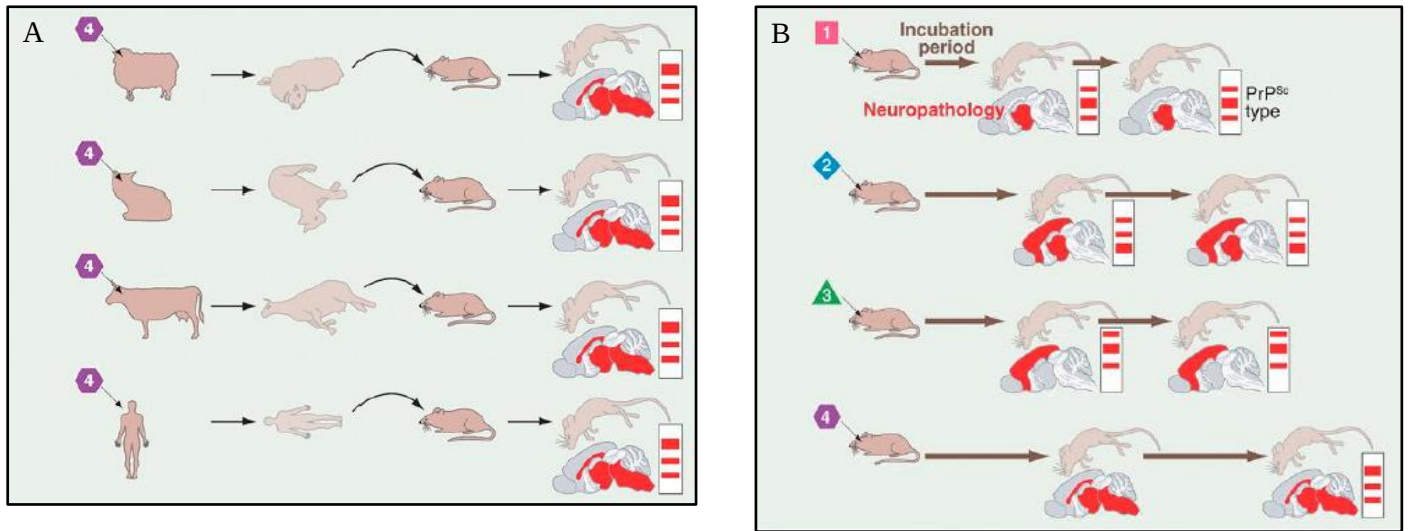


Figura 12. Panel A: las características de una cepa de prion se mantienen al propagarse en distintas especies animales. **Panel B:** en un mismo animal se pueden generar distintas cepas de priones. [Collinge J et al. 2007]

Resulta bastante difícil de imaginar cómo se mantienen y propagan las características bioquímicas de las cepas de priones en una misma especie, cómo una misma cadena polipeptídica puede dar lugar a distintas conformaciones y, éstas, a su vez, ocasionar distintos grados de patología. Así, por ejemplo, los distintos tipos de PrP^{Sc} en humanos se caracterizan por dar distintos tipos de fragmentos proteolíticos y de relación de glicofomas tras el tratamiento con proteinasa K y, además, se encuentran asociados a diferentes fenotipos clínicopatológicos de CJD.

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 los mismos 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 12). Cómo se mantienen las características estructurales y las ratios de glicosilación sigue siendo una intrigante cuestión aún sin resolver.

Por otro lado, en algunas enfermedades priónicas coexisten varias cepas de un mismo prion; ejemplos son el “scrapie” de las ovejas y la enfermedad CJD en humanos. Se piensa que diferentes poblaciones celulares dentro de un mismo huésped pueden generar distintos ambientes que conduzcan a una selección de cepas. Es más, se postula que la infección de un huésped con una “cepa linfotrófica”, que rápidamente coloniza tejidos linfoides, pero presenta una larga latencia hasta que se produce la neuroinvasión, podría deberse en parte a la necesidad de que se produzca la selección de una “cepa neuroinvasora”. Esta hipótesis se basa en la existencia de diferentes tipos de PrPSc en los tejidos periféricos de pacientes vCJD, en los que la colonización de los tejidos linfoides precede la enfermedad neurológica.

7. Una teoría unificadora de cepas y barrera de especie.

Los genes PrP de mamíferos están altamente conservados, lo que hace que las proteínas PrP tengan una estructura primaria muy similar, esto es probablemente la razón fundamental que explica la habilidad de los priones para infectar a especies distintas.

Se piensa que, por razones termodinámicas, dictadas por su secuencia primaria, una determinada PrPSc va a ser capaz de adoptar una serie de conformaciones infecciosas. En consecuencia, sólo se va a producir propagación de un prión entre dos especies, cuando sus correspondientes proteínas PrP sean capaces de adoptar una serie de estados conformacionales similares; no dándose propagación cuando la PrP de la especie receptora sea incapaz de adoptar una conformación PrPSc permisiva, existiendo así una barrera de transmisión (figura 13). En este modelo, la facilidad de transmitirse entre especies de un prión vendrá dada por el mayor solapamiento de estados conformacionales que las PrPc de huésped y donador compartan.

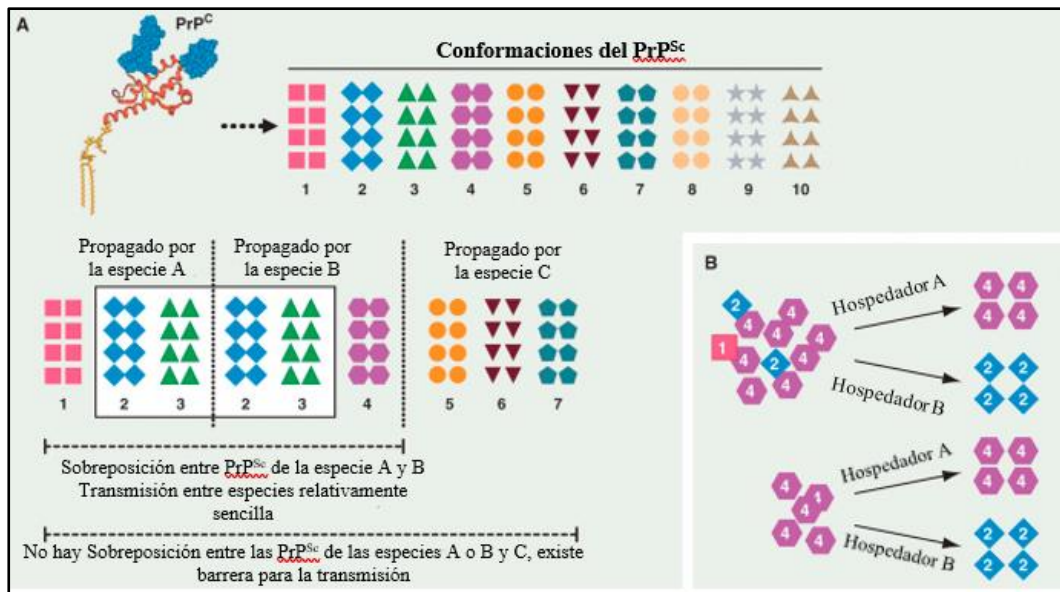


Figura 13. Esquema explicativo de la teoría de la Barrera de Transmisión entre especies. Las PrP^{Sc} pueden adoptar un gran número de conformaciones cada una generando diferentes cepas de priones con diferentes efectos patológicos, las cuales se transmitirán con más facilidad entre especies cuando más similares sean las conformaciones de sus PrPs. [Modificada a partir de figura de Collinge & Clarke (2007)]

Volviendo a la alta capacidad de cruzar especies del prion BSE, esta cepa debe representar una conformación termodinámicamente muy favorable que es transmitida con facilidad a un gran número de especies diferentes, dando cuenta de la gran promiscuidad de esta cepa entre los mamíferos. Ciertamente, esta cepa fue seleccionada por un proceso industrial en el que los desechos de animales se reciclaban, lo que posiblemente favoreció la reinfección de animales, hasta que se generó la epidemia BSE en Reino Unido. De hecho, la cepa BSE es particularmente termoestable, lo que seguramente es un factor favorecedor del proceso.

Otro ejemplo ilustrador del modelo de selección clonal lo encontramos en el polimorfismo PrP humano (M129V), conocido desde hace mucho tiempo por ser un determinante clave de susceptibilidad genética a las enfermedades priónicas. Es de destacar, que todos los pacientes con vCJD ensayados (≈ 200) son homocigóticos para el alelo metionina en posición 129 (un genotipo que constituye aproximadamente 1/3 de la población normal). La razón parece estar en que la valina en posición 129 de la PrP humana no es capaz de adoptar la conformación asociada con la cepa BSE.

Cabe destacar también la existencia de una variante de la PrP, G127V co-seleccionada junto con el polimorfismo más común M129V durante las epidemias de Kuru. Esta variante G127V introducida en ratones humanizados genera total resistencia a los 18 tipos de cepas infectivas de PrP conocidas en el hombre lo que atestiguar el poco conocimiento que se tiene sobre el funcionamiento de las cepas y el gran número de variaciones que puede presentar en su secuencia.

8. Aproximaciones al tratamiento de las enfermedades TSE.

No existen terapias efectivas para el tratamiento de las formas clínicas de las enfermedades TSE en humanos. Esto es debido en parte a que cuando se observan los síntomas clínicos ya se han producido lesiones neuropatológicas. Sin embargo, en modelos animales de TSE algunas drogas han mostrado ser capaces de inhibir la acumulación de PrP-res y retrasar la aparición de los síntomas clínicos. Además, estos inhibidores han sido utilizados como pruebas del mecanismo de formación de PrP-res y su relación con la patogenicidad e infectividad.

Por un lado, se ha visto que la presencia de PrP heterólogas en cultivos de tejidos infectados con “scrapie” bloquea la formación de PrP-res. La PrP-sen heteróloga es capaz de unirse al sitio de conversión sobre la PrP-res sin convertirse a la forma resistente a proteasa, al tiempo que interfiere con la unión de la PrP-sen homóloga endógena (figura 14). Estos datos plantean la posibilidad de que una terapia génica en la que una PrP heteróloga sea expresada en el paciente y pueda ser efectiva frente al desarrollo de TSE.

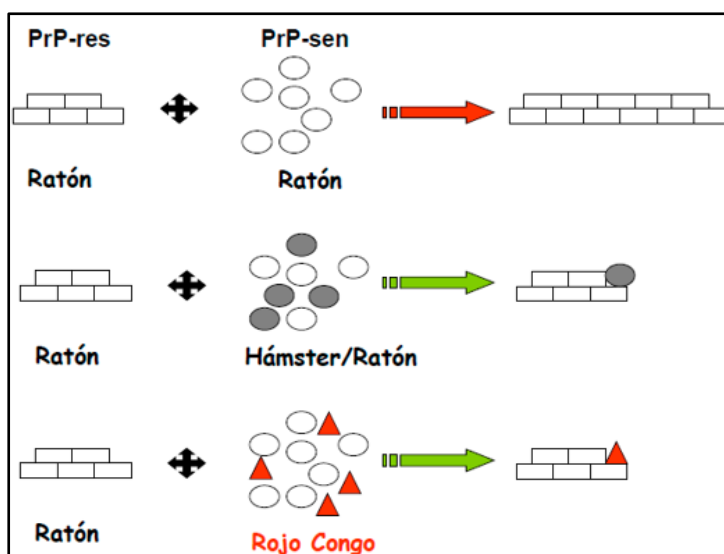


Figura 14. Hipótesis de la inhibición de la formación de PrPSc por moléculas PrPC heterólogas y polianiones. A) Incorporación de PrPC homóloga en un polímero de PrPSc. B) Interferencia en la incorporación de PrPC homóloga por moléculas PrPC heterólogas que sí se unen, pero que no se convierten en PrPSc. C) Inhibición de la formación de PrPSc por rojo Congo y otros polianiones que se unen a PrPSc o PrPC. [Modificada a partir de figura de Chesebro & Caughey (1997)]

Por otro lado, dos tipos de compuestos polianiónicos (glicanos sulfatados (figura 15, 2-aminotiazoles) y polioxometalatos) se ha visto que impiden el desarrollo del “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.

- El rojo Congo
- Los glicanos sulfatados

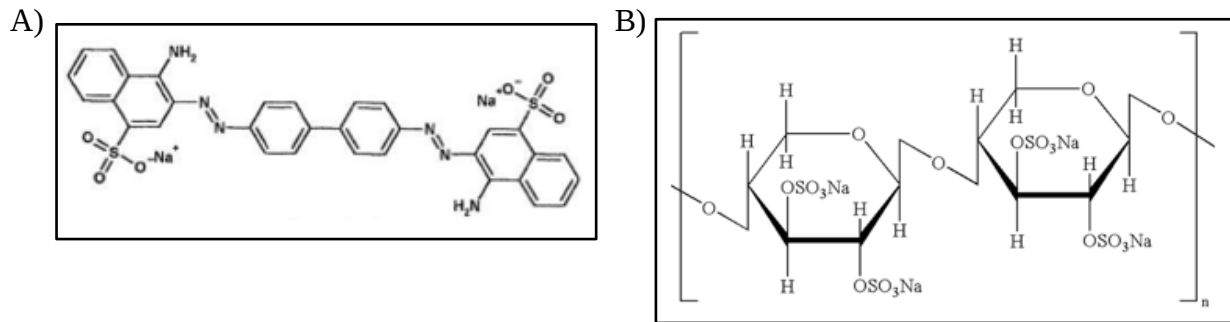


Figura 15. Estructura molecular de polianiones. A) **Rojo Congo**, sal de sodio utilizada como colorante en histología y que sirve como indicador de pH dado que cambia de color con el mismo. Poco usado por ser carcinogénico. B) **Glicanos sulfatados**, en la imagen **Pentosan Polisulfato**, un antitrombolítico empleado ante la cistitis intersticial..

Ambos se unen tanto al PrP-res como al PrP-sen. Estos hechos sugieren que el mecanismo de acción de estos compuestos es a través de interferir con la interacción entre PrP y los glicosaminoglicanos sulfatados endógenos que puede ser necesaria para la acumulación de PrP-res. Un mecanismo similar se ha sugerido para el efecto inhibitorio en la formación de PrP-res observado con el colorante rojo Congo.

Otra vía de investigación está dirigida al estudio de anticuerpos frente a los priones como método terapéutico. Estos estudios se basan en la observación de que anticuerpos frente a la proteína PrP son capaces de bloquear la replicación de los priones tanto in vitro como in vivo. Así, ratones que producen anticuerpos frente a PrP o son inoculados con un anticuerpo monoclonal frente a PrP no van a desarrollar enfermedad cuando son infectados con priones. Como los anticuerpos no llegan al cerebro, al no atravesar la barrera hematoencefálica, estos estudios indican que los anticuerpos bloquean a los priones antes de que alcancen el SNC. Por tanto, esta aproximación tendría validez siempre que no se haya producido la infección del SNC. No obstante, cabe indicar que recientemente se ha desarrollado anticuerpos anti-PrP con capacidad de atravesar la

barrera hematoencefálica, basados en la utilización de cadenas monocatenarias de anticuerpos, como ocurre de forma natural en los anticuerpos de camélidos.

Uno de los problemas que tiene esta aproximación es que resulta muy difícil inducir una respuesta inmunitaria frente a la PrP. La razón es que el sistema inmunitario de los mamíferos es esencialmente tolerante a PrP^C dado que es expresada en la superficie de la mayoría de las células del organismo.

Otro grupo prometedor de compuestos que retrasan la acumulación de PrP^{Res} y el desarrollo del “scrapie” experimental en roedores es la droga antifúngica anfotericina B y sus análogos. El mecanismo de acción es desconocido. El tratamiento, para ser efectivo, debe comenzar mucho antes de la aparición de síntomas clínicos de enfermedad. Lo malo es que la anfotericina B presenta cierta toxicidad que desaconseja un tratamiento incontrolado.

Existe otra vía de inmunización preventiva: “Inmunización activa de la mucosa intestinal” (figura 16). Es una técnica en la que se administra oralmente la bacteria *Salmonella enterica* atenuada y que expresa PrP generando una respuesta humoral. Esto permite a las células presentadoras de antígenos entrar en contacto con las PrP, de forma que se induzca una secreción de IgA contra ellas y se dé un estado de protección contra los priones que generan infección tras la ingesta. Esto se aprecia en los experimentos realizados en ciervos contra una enfermedad priónica clásica de los mismos “Chronic wasting disease” (CDW) donde 1 de cada 5 superaba la tolerancia inmune a las PrP y generaban una respuesta IgA contra la proteína.

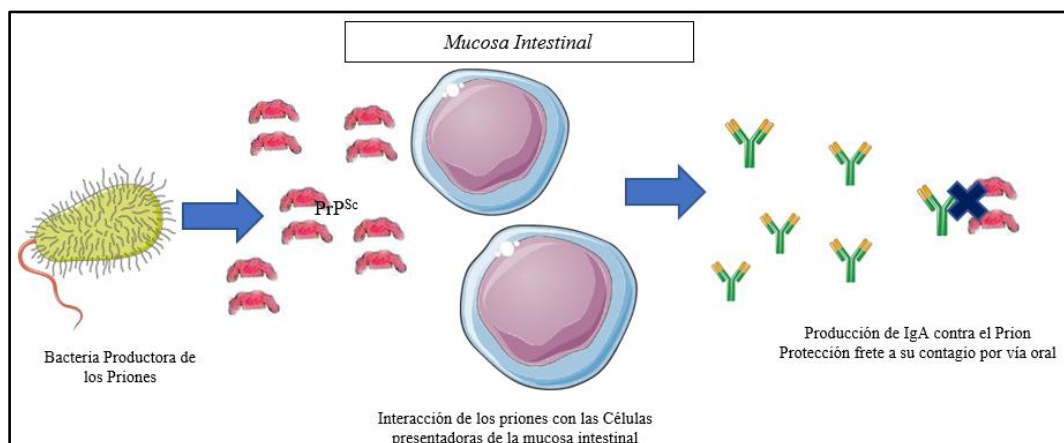


Figura 16. Inmunización activa de la mucosa intestinal. Inoculación del intestino del animal con bacterias modificadas genéticamente para producir el prion e iniciar una respuesta humoral que culmine en la generación de IgAs en la mucosa que protejan al individuo frente a la infección por priones por vía oral.

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.

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.

9.1. 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 está de acuerdo con la necesidad de que exista PrP-sen para ser convertida 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, aunque su función fisiológica no es muy bien conocida. Se le han atribuido varias funciones: 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. También se encuentra soluble en varios fluidos corporales como el plasma o la leche.

Sin embargo, los ratones deficientes en PrP-sen, no muestran un fenotipo claro que pueda relacionarse con la falta de PrP-sen, probablemente debido a mecanismos compensatorios. Lo que 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 intervenir en múltiples aspectos celulares (papel pleiotrópico) y se postula que podría estar implicada en vías de señalización celular.

Entre las funciones que la proteína PrP^C podría estar desempeñando se han sugerido las siguientes. Dada su alta afinidad por cobre, se piensa que podría ser un transportador de cobre. También, en este sentido, se ha planteado un efecto antioxidante, reduciendo los niveles de especies reactivas de oxígeno. También podría estar implicada en la neurotransmisión. Por otro lado, dada su capacidad por interaccionar con laminina, se ha sugerido un posible papel en adhesión celular y en la regulación de la neuritogénesis.

9.2. PrP y neurotoxicidad.

Cuál es la causa de la muerte celular durante la neurodegeneración provocada por los priones es una cuestión clave que está aún sin resolver. La pérdida de función de PrP^C no parece ser una causa suficiente: los ratones deficientes en el gen PrP son esencialmente 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.

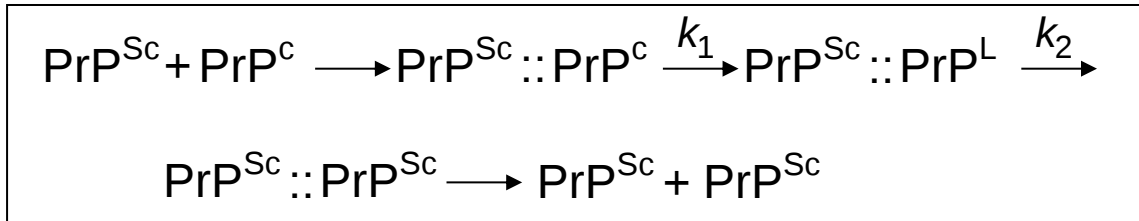
Aunque en estudios in vitro se ha visto que la PrP^{Sc}, e incluso algunos péptidos derivados de la PrP, podrían resultar neurotóxicos, existen varias evidencias experimentales que sugieren que esto no es así in vivo. Por un lado, se ha visto que no existe una relación directa entre la cantidad de depósitos PrP^{Sc} y la aparición de síntomas clínicos. Por otro lado, se ha visto que la PrP^{Sc} no resulta tóxica a neuronas que no expresan PrP^C. Además, se ha visto 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, aunque no presentan síntomas clínicos de enfermedad priónica cuando son infectados experimentalmente, sí que sus cerebros acumulan placas de PrP^{Sc}. 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 que este anclaje no se necesita para la replicación del prion.

Así, 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, “de letal”), que sería generada como un intermediario o producto secundario durante la propagación de los priones. En la figura 18 se muestra el modelo 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:



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 .

También existe otro modelo (figura 17B), donde PrP^{Sc} es producido se forma autocatalítica, sin que haya productos intermediarios tóxicos. Sin embargo, PrP^{Sc} catalizarían así mismo la conversión de PrP^C a PrP^L como un producto tóxico secundario.

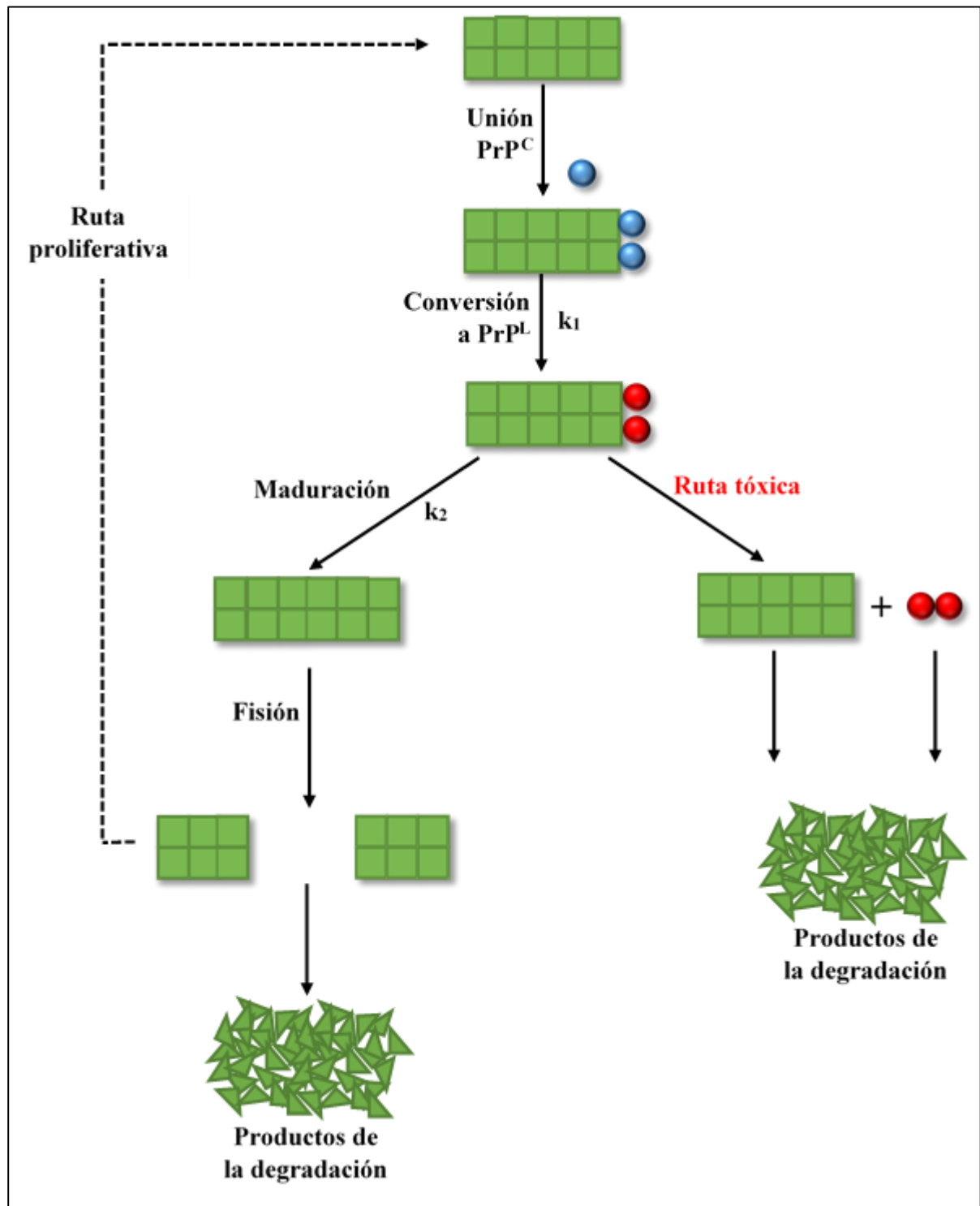


Figura 17A. Modelo A. La patología estaría causada por una baja velocidad de maduración (baja k_2), lo que lleva a la liberación del producto tóxico PrP^L (esferas rojas). Las infecciones asintomáticas tienen un ratio k_1/k_2 bajo. Las infecciones sintomáticas serán más o menos rápidas en función del valor de este mismo ratio. [Imagen modificada a partir de Collinge & Clark, 2007]

Por tanto, la diferencia entre ambos modelos radicaría en si PrP^L es un producto intermediario del proceso de transformación de PrP^C (modelo A; figura 17A) o si es un producto secundario (modelo B; figura 17B).

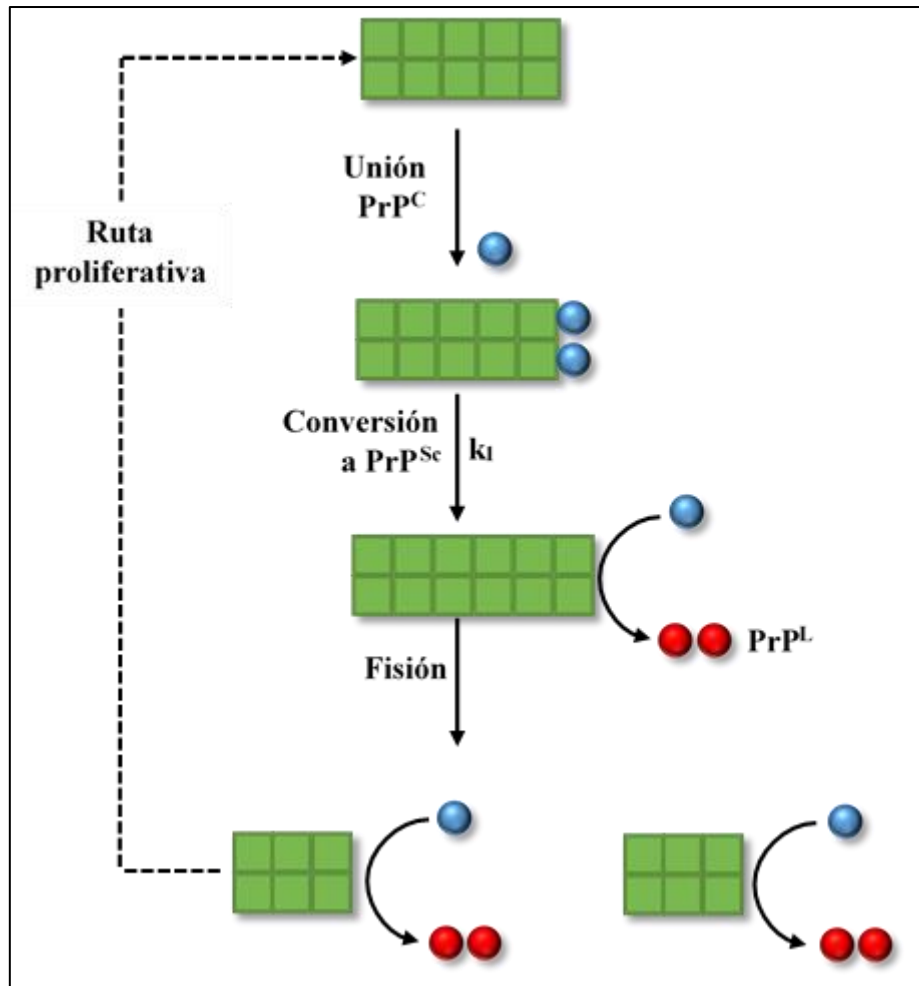


Figura 17B. Modelo B. PrP^{Sc} (cuadrados verdes) puede transformar a PrP^C (esfera azul) en PrP^{Sc} o en PrP^L (esfera roja). Esta última es la causante, según este modelo, de la enfermedad priónica y de la degeneración neuronal. [Imagen modificada a partir de Collinge & Clark, 2007]

10. Expansión de la proteína priónica en el organismo.

Dado que la proteína priónica debe acceder al SNC para causar enfermedad, la expansión entre tejidos es un requisito para que esto ocurra (figura 18). Por ejemplo, tras la exposición oral, que es una forma frecuente de transmisión, los priones atraviesan la mucosa intestinal, posiblemente a través de los parches de Peyer, e interaccionan con la superficie de las células dendríticas foliculares del tejido linfoide, desde donde pueden interaccionar con los nervios entéricos que los conducirán al SNC.

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica se adquiere por la transferencia de la hormona de crecimiento contaminada con priones, trasplantes de duramadre de cadáveres, instrumentos quirúrgicos contaminados, trasplantes corneales y transfusiones sanguíneas.

Por otro lado, también tiene que ocurrir una transmisión entre células. Se piensa que es preciso que exista una proximidad entre ellas y posiblemente una transferencia de membrana entre las células, dado que la proteína PrP-res se encuentra anclada a la membrana de la célula infectada a través del anclaje GPI. Esto ha llevado a plantear que los exosomas pueden ser un mecanismo adecuado para la propagación de los priones entre las células.

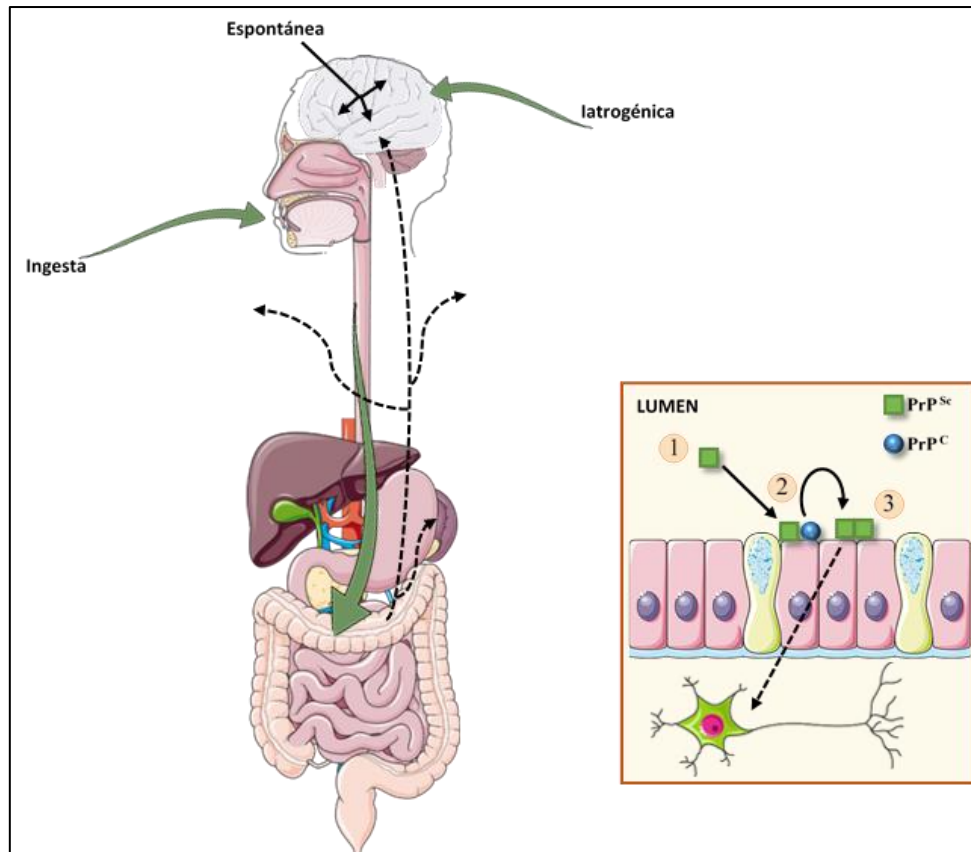


Figura 18. La patología puede aparecer de tres formas. A través de la ingesta, si se ingiere alguna proteína priónica. Ésta transformará a las PrP^C del intestino y atravesarán la barrera de células epiteliales hasta llegar a las neuronas y, de aquí, hasta el SNC. La enfermedad también puede tener un origen iatrogénico, por el uso de material médico mal esterilizado (entre otras causas), en cuyo caso aparecería directamente en el cerebro. Así mismo, la enfermedad puede ser espontánea, si no ha ocurrido ninguna de las situaciones previamente mencionadas. [Imagen modificada a partir de Kraus et al. (2013)]

11. Cuestiones por resolver

Aún existen muchas incógnitas sobre los mecanismos patológicos que desencadenan los priones y otros aspectos, como son:

- 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.
- Y la cuestión fundamental, la función fisiológica de PrP^C, también permanece sin resolver.

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.

Por otro lado, procesos neuropatológicos como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington, son causados por la acumulación de proteínas denominadas “prion-like”: la proteína amiloide β y tau (Alzheimer), la sinucleína α (Parkinson) y la proteína huntingtina (Huntington). Si bien, la naturaleza infecciosa de estos procesos no ha sido probada. Sin embargo, sí que hay estudios recientes que, aunque no concluyen que estas enfermedades puedan considerarse como priónicas, sí que demuestra la similitud en los mecanismos moleculares con las enfermedades priónicas, sobre todo en el mecanismo de degeneración neuronal. Por esto mismo, estos estudios sugieren que la enfermedad de Alzheimer o la de Parkinson podrían tener tratamientos similares a los de las enfermedades 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.
- **Asante EA, Smidak M, Grimshaw A, Houghton R, Tomlinson A, Jeelani A, Jakubcova T, Hamdan S, Richard-Londt A, Linehan JM, Brandner S, Alpers M, Whitfield J, Mead S, Wadsworth JD, Collinge J.** (2015) A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease. *Nature*; 522(7557):478-81.
- **Baskakov, I. V.** (2014). The many shades of prion strain adaptation. *Prion*, 8(2), 169–172.
- **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.
- **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.
- **Das, A.S. and Zou, W.Q.** (2016). Prions: Beyond a Single Protein. *Clin Microbiol Rev* 29: 633-658.
- **Fang, C., Wu, B., Le, NTT., Imberdis, T., Mercer, RCC., Harris, DA.** (2018) Prions activate a p38 MAPK synaptotoxic signaling pathway. *PLOS Pathogens* 14(9): e1007283.
- **Gasset, M. y Pajares, M.A.** (2006) Priones. En: *virus patógenos* (L. Carrasco y J.M. Almendral, eds.). Editorial Hélice, Fundación BBVA.
- **Giese, A. and Kretzschmar, H.A.** (2001) Prion-induced neuronal damage –the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 253: 203-217.
- **Gough, K. C., Rees, H. C., Ives, S. E., and Maddison, B. C.** (2015). Methods for Differentiating Prion Types in Food-Producing Animals. *Biology*, 4(4), 785–813.
- **Green A.J.E.** (2018). RT-QuIC: a new test for sporadic CJD. *Practical Neurology* Published Online First:03 October 2018.

- **Ironside, J. W. and Head, M. W.** (2004). Neuropathology and molecular biology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 284: 133-159.
- **Knight, R.** (2017) Infectious and sporadic prion diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 150:293-318
- **Kraus, A., Groveman, B.R. and Caughey, B.** (2013). Prions and the potential transmissibility of protein misfolding diseases. *Annu Rev Microbiol* 67: 543-564.
- **Pocchiari, M. and Manson, J.** (2018) Handbook of Clinical Neurology, Vol. 153 (3rd series) Human Prion, Prion Diseases.
- **Orru CD, Wilham JM, Vascellari S, Hughson AG, Caughey B** (2012) New generation QuIC assays for prion seeding activity, *Prion*, 6:2, 147-152.
- **Ritchie DL, Ironside JW.** (2017) Neuropathology of human prion diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 150:319–39
- **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.
- **Toliva-Fernández, J., Navarro Incio, A., Ordóñez Cambor, C.; Pérez Carbajales, C., Martínez Pinilla, E.** (2005) Tinción fluorescente extrasensible para los depósitos amiloideos cerebrales utilizando el rojo congo en solución alcohólica. 7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. (Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Tolivia/publication/237652690_Tincion_fluorescente_extrasensible_para_los_depositos_amiloideos_cerebrales_utilizando_el_Rojo_Congo_en_solucion_alcoholica/links/00b49526ee5c6b58f1000000/Tincion-fluorescente-extrasensible-para-los-depositos-amiloideos-cerebrales-utilizando-el-Rojo-Congo-en-solucion-alcoholica.pdf)
- **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.
- **Zugmaier G, Lippman ME, Wellstein A.** (1992) Inhibition by pentosan polysulfate (PPS) of heparin-binding growth factors released from tumor cells and blockage by PPS of tumor growth in animals. *J Natl Cancer Inst.* Nov 18;84(22):1716-24

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]
- <https://smart.servier.com/> [De esta web se han obtenido las imágenes para generar las figuras 17 y 19]