

## LA VIA EXPERIMENTAL

### *Priones: solución de un enigma médico*

En 1957, Carleton Gajdusek trabajaba como científico visitante en Australia estudiando genética viral e inmunología. Su interés en los problemas médicos de las culturas nativas lo había llevado a las cercanías de Nueva Guinea para lo que él esperaba sería una visita breve antes de regresar a casa en Estados Unidos. Un par de días después de su llegada a Nueva Guinea, Gajdusek habló con Vincent Zigas, médico local, quien le habló acerca de una misteriosa enfermedad que causaba más de la mitad de las muertes entre los pobladores de unas remotas montañas de la isla. Los nativos llamaban a la enfermedad kuru, que significaba "sacudidas o temblores", debido a que en las primeras etapas las víctimas presentaban temblores involuntarios. En los siguientes meses, las víctimas (principalmente mujeres y niños) evolucionaban pasando por etapas de debilidad creciente, demencia y parálisis, que finalmente les arrancaba la existencia. Gajdusek decidió abandonar sus planes de viaje y permanecer en Nueva Guinea para estudiar la enfermedad.

Al escuchar los síntomas de la enfermedad, Gajdusek concluyó que las personas de la región probablemente sufrían encefalitis viral epidémica. La enfermedad tal vez se propagaba entre la población por la práctica ritual de comer ciertas partes del cuerpo de los parientes muertos. Como en las aldeas las mujeres eran quienes preparaban los cuerpos, tenían oportunidad de participar en esta forma de canibalismo y serían ellas las que estuvieran en mayor peligro de contraer la infección. En los meses subsiguientes, Gajdusek ayudó a cuidar a los aldeanos enfermos en un hospital improvisado, efectuó autopsias de los pacientes muertos y preparó muestras de tejidos y de líquidos para enviar a los laboratorios de Australia. En una de sus primeras cartas al exterior, Gajdusek escribió: "Tuvimos un paciente muerto de kuru y efectuamos autopsia completa. La practiqué a las 2:00 a.m. bajo el rugido de una tempestad en una choza nativa con la luz de una linterna; seccioné el cerebro sin bisturí."<sup>1</sup> Los cortes del cerebro revelaron que las víctimas de kuru morían como resultado de un extenso proceso degenerativo en el cerebro.

Se comenzaron a acumular pruebas de que el kuru no era una infección viral. Los pacientes muertos de Kuru no mostraban ninguno de los síntomas que normalmente acompañan a las infecciones del sistema nervioso central, como fiebre, inflamación encefálica y cambios en la composición del líquido cefalorraquídeo. Además, los mejores laboratorios de virología de Australia no pudieron cultivar agente infeccioso alguno en las muestras de tejido enfermo. Gajdusek empezó a considerar explicaciones alternativas como causa del kuru. Había la posibilidad de que los aldeanos muertos se hubieran expuesto a algún tipo de sustancia tóxica en su dieta. Se efectuaron análisis de sangre con la esperanza de hallar concentraciones elevadas de metales, grasas o de otras toxinas comunes, pero no se encontró anomalía clínica alguna.

En este punto, Gajdusek pensó que el kuru podía ser una enfermedad hereditaria, pero a partir de comentarios con los genetistas concluyó que era muy improbable. Por ejemplo, para una enfermedad hereditaria sería prácticamente imposible lo siguiente: 1) una mortalidad tan elevada de origen al parecer reciente y que alcanzara una frecuencia tan alta en la población; 2) que se manifestara en individuos de grupos de edad tan diversa, desde niños de corta edad hasta adultos de edad avanzada; 3) que afectara en igual número a hombres y a mujeres jóvenes, pero que atacara a mujeres adultas en proporción 13 veces mayor que a los hombres; 4) que ocurriera en una persona nacida en otra región de la isla que se había mudado a vivir a la población afectada.

No parecía haber una explicación razonable de la causa del kuru. Gajdusek incluso consideró la posibilidad de que el kuru era una enfermedad mental. "Puesto que en la etapa temprana de la enfermedad muchas cosas sugieren histeria..., no puedo desechar de mi mente la idea de la psicosis. Pero el parkinsonismo típico avanzado y los trastornos de los ganglios basales que por último producen la muerte no se pueden vincular fácilmente con psicosis, a pesar del papel que esta enfermedad desempeña en la brujería, los asesinatos, las guerras locales, etc."

William Hadlow, veterinario patólogo estadounidense, había trabajado sobre una enfermedad neurológica degenerativa llamada "scrapie" (encefalitis espongiforme), común en ovejas y cabras. En 1959, Hadlow visitó una exposición en Londres, auspiciada por una compañía farmacéutica británica, donde vio muestras de neuropatología preparadas por Carleton Gajdusek de una persona muerta de kuru. Hadlow quedó impresionado por el notable parecido entre las anomalías del cerebro de las víctimas de kuru y las observadas en cerebros de ovejas muertas por encefalitis espongiforme. Se sabía que la encefalitis espongiforme era causada por un agente infeccioso; esto se había demostrado por transmisión de la enfermedad a ovejas saludables inyectándoles extractos preparados de animales muertos. El agente causante del "scrapie" era capaz de atravesar filtros que retardaban el paso de bacterias y por esa razón se asumió que se trataba de un virus. Sin embargo, a diferencia de otras enfermedades virales, los síntomas del "scrapie" no aparecían sino después de meses que el animal se había infectado con el patógeno, por lo que se le dio el nombre de "virus lento". Hadlow concluyó que el kuru y la encefalitis espongiforme eran causadas por el mismo tipo de agente infeccioso y publicó su especulación en una carta a la revista médica británica *Lancet*.<sup>2</sup> Luego de leer la carta publicada y de hablar con Hadlow, Gajdusek quedó convencido de que su primera idea acerca del kuru como enfermedad infecciosa era correcta. Luego de varios años de trabajo finalmente Gajdusek pudo demostrar que el kuru se transmitía por extractos de tejido humano a primates de laboratorio.<sup>3</sup> El periodo de incu-



bación entre la inoculación de los animales y la aparición de los síntomas de la enfermedad era de casi dos años. El kuru vino a ser así la primera enfermedad humana en la cual se demostró que la causa era un virus lento.

Varios años antes, Igor Klatzo, perspicaz neuropatólogo de los National Institutes of Health (NIH) había dicho a Gajdusek que una rara enfermedad *hereditaria* llamada enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ) producía anomalías en el cerebro que recordaban las del kuru. Tres años después de haber confirmado que el kuru podía transmitirse del hombre a los animales, Gajdusek y sus colaboradores demostraron mediante extractos preparados por biopsia del cerebro de una persona muerta por ECJ que ésta podía transmitirse a los animales.<sup>4</sup> También había varios casos comprobados en los cuales la ECJ era transmitida de un ser humano a otro durante procedimientos quirúrgicos, como trasplante de córnea, o en extractos de hormona de crecimiento preparada a partir de glándula hipófisis de cadáveres.

¿Cómo se podía vincular una enfermedad hereditaria, como la de Creutzfeldt-Jacob, con la presencia de un agente infeccioso? La respuesta a esta pregunta se ha revelado en los últimos 15 años, principalmente a través del trabajo de Stanley Prusiner y sus colegas de la Universidad de California, en San Francisco. Prusiner comenzó estudiando las propiedades del agente causal de la encefalitis espongiforme y pronto llegó a dos conclusiones muy estimulantes.<sup>5</sup> Primero, el agente era muy pequeño, mucho más pequeño que cualquier virus conocido, con peso molecular total de 27 000 a 30 000 daltons. Segundo, al parecer el agente carecía de un ácido nucleico entre sus elementos y estaba compuesto exclusivamente de proteínas. Esta segunda conclusión se basaba en el tratamiento exhaustivo de extractos de cerebros infectados con enzimas y otras sustancias capaces de digerir o destruir proteínas o ácidos nucleicos. El tratamiento con enzimas destructoras de proteínas, como enzimas proteolíticas o fenol, producía extractos inofensivos, en tanto que el tratamiento con agentes destructores de ácidos nucleicos, incluyendo diferentes tipos de nucleasas y radiación ultravioleta, no mostraba efecto alguno sobre la infecciosidad. La resistencia del agente de la encefalitis espongiforme a la radiación ultravioleta en comparación con la de los virus se muestra en el cuadro VE 1-1. Prusiner llamó al agente causal de la encefalitis espongiforme, y presumiblemente también del kuru y de la ECJ, un *prión*, derivado de partícula *proteinácea infecciosa*.

La idea de un patógeno infeccioso constituido exclusivamente de proteínas fue vista con gran escepticismo, pero estudios subsiguientes de Prusiner y otros no han demostrado manera alguna de modificar la conclusión original. En 1985 se demostró que la proteína prión es codificada por un gen situado dentro de los propios cromosomas de la célula.<sup>6</sup> El gen se expresa en el tejido cerebral *normal* y codifica una proteína de 254 aminoácidos designada PrP<sup>C</sup> (por proteína prión celular), cuya función aún se desconoce. Una forma modificada de la proteína (designada PrP<sup>Sc</sup>, por proteína prión scrapie) se encuentra en el cerebro de animales con "scrapie". A diferencia de la PrP<sup>C</sup> normal, la versión modificada de la proteína se acumula dentro de las células nerviosas formando agregados que aparentemente matan a la células. La PrP<sup>Sc</sup> no sólo provo-

ca los cambios degenerativos característicos del scrapie en el cerebro, sino también se presume que es el agente infeccioso capaz de transmitir la enfermedad de un animal a otro.

Luego que se descubrió que el scrapie podía ser resultado de la modificación del producto de un gen normal, fue posible explicar cómo una enfermedad genética, como la de Creutzfeldt-Jacob, podía transmitirse de un individuo a otro. Casi todos los genes presentes en el ser humano también lo están en otros mamíferos, y por lo tanto hay una versión humana del PrP. Presumiblemente, si este gen humano sufre algún tipo de mutación, produciría una proteína PrP<sup>Sc</sup> análoga a la proteína modificada de la oveja en cuanto a su actividad. Como es de esperarse, el análisis del DNA aislado de cierto número de pacientes humanos con ECJ reveló la presencia de mutaciones específicas en el gen que codifica PrP (fig. VE 1-1).<sup>7</sup> En los últimos años, el análisis genético de la susceptibilidad a enfermedades causadas por priones depende de ratones sometidos a procesos particulares de ingeniería genética. Se han desarrollado dos tipos de ratones modificados: unos que carecen por completo del gen PrP (a los cuales se denominan ratones "sin sentido" carentes de PrP) y otros que contienen una o más copias de la forma mutada del gen PrP humano (a los que se les da el nombre de ratones transgénicos PrP).

Puesto que la proteína PrP se produce normalmente en el cerebro (y otros órganos de los ratones), podría esperarse que la ausencia del gen causara consecuencias terribles con desarrollo de la conducta de ratones carentes de PrP. Sin embargo, a pesar de esta expectativa los ratones que carecen del gen PrP no muestran los efectos de la enfermedad.<sup>8</sup> Hay varias explicaciones razonables para este resultado, incluyendo la posibilidad de que la función normal de la proteína PrP sea sustituida por otra proteína producida por un gen relacionado; en otras palabras, el ratón tiene un sistema "de respaldo" que puede dispensar la proteína PrP. De cualquier manera, los ratones que carecen del gen PrP y por lo tanto no pueden sintetizar proteína PrP<sup>C</sup>, no desarrollan el scrapie cuando se inyectan en su cerebro priones de ratones con scrapie (fig. VE 1-2).<sup>9</sup> Así pues, para que un ratón sea susceptible a la enfermedad, el

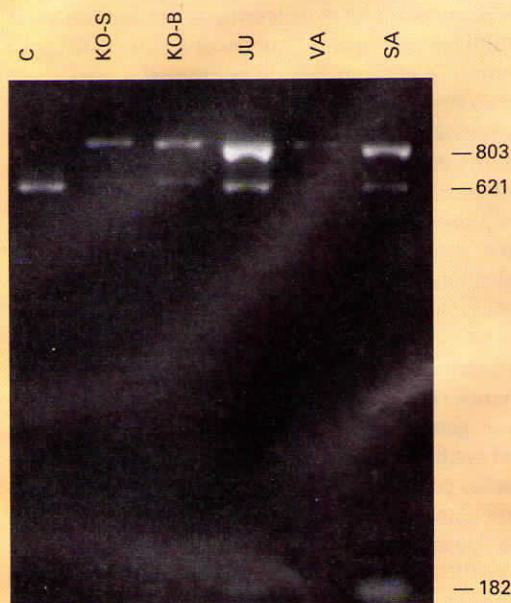
CUADRO VE 1-1. Inactivación de agentes infecciosos pequeños por radiación UV a 254 nm

Ejemplo	D <sub>37</sub> (J/m <sup>2</sup> )*
Bacteriófago T2	4
Bacteriófago S13	20
Bacteriófago ΦX174	20
Virus del sarcoma de Rous	150
Poliomavirus	240
Virus de la leucemia de Friend	500
Virus de la leucemia murina	1 400
Viroide de los tubérculos fusiformes de la patata	5 000
Agente del "scrapie" (encefalitis espongiforme)	42 000

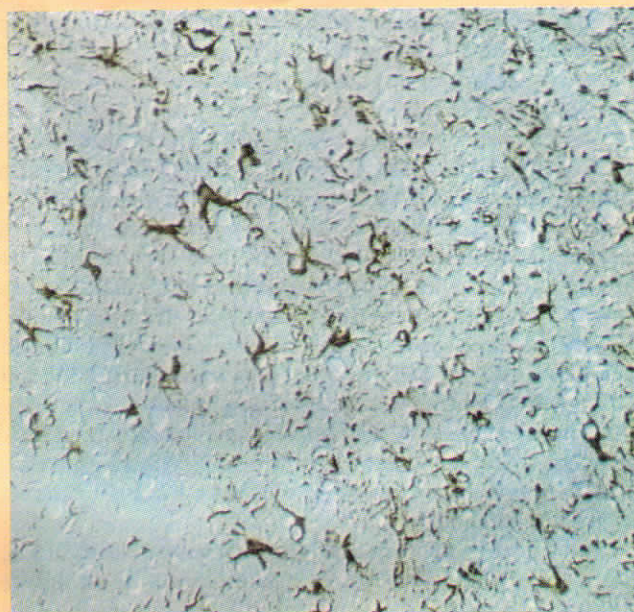
\* D<sub>37</sub> es la dosis de radiación que permite una supervivencia de 37 por ciento.

Reimpreso, con permiso, según S.B. Prusiner, *Science* 216:140, 1982. Copyright 1982 American Association for the Advancement of Science.

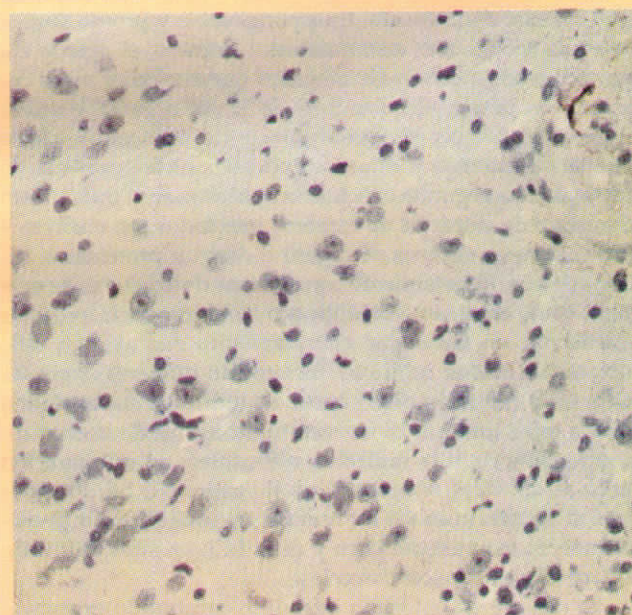




**FIGURA VE 1-1.** Esta figura muestra la fotografía de un gel en el cual el DNA del gen PrP de algunas personas diferentes se trató con una enzima (llamada BsmA1), que desdobla el DNA en cualquier punto donde encuentra una secuencia particular de nucleótidos. Luego de incubar el DNA con la enzima, el gel es sometido a electroforesis, que separa todos los segmentos presentes en la mezcla de reacción. Las marcas en la parte de arriba indican los individuos de los cuales se obtuvo el DNA y los números a la derecha indican la longitud de los fragmentos de DNA (expresada en pares de bases) visibles dentro del gel. (El DNA se hace visible incubando el gel con un DNA unido a un colorante fluorescente.) La vía indicada por C muestra el DNA de un individuo saludable, las siguientes tres vías (marcadas KO-S, KO-B y JU) muestran el DNA de pacientes con ECJ miembros de familias en las cuales la enfermedad es común. Las dos últimas vías muestran el DNA de dos pacientes con casos esporádicos de ECJ, o sea, casos donde no hay muestras de la enfermedad en otros miembros de la familia. Cuando el DNA del gen PrP de cada uno de los pacientes con ECJ se trata con la enzima, se observa que la mitad del DNA es resistente a la enzima. Esta resistencia está indicada por la presencia de fragmentos de DNA más largos, 803 pares de bases. Por lo contrario, todo el DNA PrP de la persona saludable es desdoblado por la enzima según se manifiesta por la ausencia de los 803 fragmentos de pares de bases. En lugar de eso, este segmento de DNA se fragmenta en dos pedazos, uno de 621 pares de bases y el otro de 182 pares de bases de longitud. La mitad del PrP DNA (que representa un alelo) de los pacientes con ECJ no es fragmentada por la enzima debido a que su secuencia de nucleótidos cambió por una mutación. El alelo mutado ya no contiene la secuencia que la enzima reconoce como un sitio potencial de fragmentación. Todos estos pacientes con ECJ tienen la misma mutación: un cambio del nucleótido G a nucleótido A en el codón 200 que provoca un cambio de glutamina a lisina en la proteína codificada. Este cambio en la secuencia de aminoácidos causa la enfermedad. (Cortesía de Lev Goldfarb.)



(a)



(b)

**FIGURA VE 1-2.** a) Aspecto microscópico de la porción talámica del cerebro de un ratón afectado de encefalitis espongiforme como resultado de la inoculación previa con priones de "scrapie". El tejido cerebral muestra degeneración espongiforme. b) Aspecto de una porción correspondiente del cerebro de un ratón manipulado genéticamente que carece del gen PrP normal. Igual que el ratón en a, este ratón también fue inyectado con priones de "scrapie" 20 semanas antes, pero debido a que carece del gen PrP y por lo tanto no tiene capacidad para producir la proteína PrP, no es susceptible al agente infeccioso y su tejido cerebral aparece normal. (Cortesía de Adriano Aguzzi y C. Weissmann.)



animal debe ser capaz de producir la proteína PrP en sus propios genes; no es suficiente que se introduzca en su cuerpo la proteína anormal. Estos datos apoyan la hipótesis de que la proteína PrP es indispensable para la propagación del prión durante la infección. Como se hizo notar antes, también se han efectuado estudios empleando ratones transgénicos; o sea, ratones sometidos a ingeniería genética para que sean portadores de genes extraños entre sus cromosomas. Cuando se transfiere a los ratones un gen PrP humano mutado, los animales transgénicos desarrollan el mismo tipo de enfermedad cerebral neuropatológica como la observada en el hombre.<sup>10</sup> Este experimento demuestra que la presencia de un solo gen mutado, que codifica una sola proteína anormal, es suficiente para causar todos los síntomas que acompañan a la devastadora enfermedad neurológica.

### PREGUNTAS SIN RESPUESTA

Todavía está sujeta a controversia la idea de que un agente formado por una sola proteína puede provocar una enfermedad infecciosa. Algunos biólogos opinan que la proteína prión se acompaña de pequeños fragmentos de un ácido nucleico todavía por descubrirse; otros piensan que la proteína prión hace que el individuo sea susceptible a la infección por un segundo agente, por ejemplo, un virus que realmente causa la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad en los ratones transgénicos por un gen mutante que codifica la proteína prión es un argumento para que la proteína sea la única causa, pero este dato reforzaría mucho la hipótesis si se pudiera demostrar que los extractos de cerebro de ratones transgénicos pueden transmitir la enfermedad a ratones normales no transgénicos. En la actualidad, los intentos para transmitir la enfermedad de esta manera sólo han tenido éxito limitado y el asunto todavía permanece confuso.<sup>11</sup>

Otro tema que permanece sin respuesta es el mecanismo mediante el cual el agente infeccioso incrementa su número (duplicación) dentro de un individuo infectado, como claramente ocurre. En general, sólo se atribuye duplicación a los ácidos nucleicos. ¿Cómo es posible que una proteína produzca más de sí misma? Esta pregunta sin respuesta todavía es uno de los principales "puntos débiles" en el concepto íntegro de los priones como agentes infecciosos. Prusiner y sus colegas han reunido pruebas que sugieren que las dos versiones de la proteína PrP, PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup>, difieren en su estructura tridimensional (*conformación*). En otras palabras, la misma proteína puede existir en dos formas diferentes.<sup>12</sup> Según esta hipótesis, la

proteína normalmente existe en la forma PrP<sup>C</sup>. Sin embargo, en el ser humano o los animales que desarrollan enfermedades prión se favorece la formación de la estructura PrP<sup>Sc</sup> y se acumula la proteína anormal. En el caso de enfermedades infecciosas por prión, como el kuru o el scrapie, Prusiner sugiere que la duplicación se inicia cuando una versión scrapie de la proteína PrP se une a la proteína PrP normal (o una versión no desplegada de la proteína), que transforma la proteína normal en la forma modificada.<sup>13</sup> Por lo tanto, si una molécula PrP<sup>Sc</sup> se une a una PrP<sup>C</sup>, este hecho generaría dos moléculas PrP<sup>Sc</sup> que podrían entonces enlazarse a dos moléculas más de PrP<sup>C</sup> produciendo cuatro moléculas PrP<sup>Sc</sup>, y así sucesivamente.

Aunque las enfermedades prión son muy raras, otros trastornos degenerativos nerviosos, como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, son muy comunes. Se espera que el estudio de las enfermedades prión será útil para entender la base de padecimientos humanos más comunes.

### BIBLIOGRAFIA

1. Farquhar, J. y Gajdusek, D.C. 1981. *Kuru*. Raven Press.
2. Hadlow, W.J. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet* 2:289-290.
3. Gajdusek, D.C. y cols. 1966. Experimental transmission of a kuru like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796.
4. Gibbs, C.J. Jr. y cols. 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): Transmission to the chimpanzee. *Science* 161: 388-389.
5. Prusiner, S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
6. Oesch, B. y cols. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-39 protein. *Cell* 40:735-746.
7. Goldfarb, L.G. 1990. Identical mutations in unrelated patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 336:174-175.
8. Büeler, H. y cols. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 336: 577-582.
9. Büeler, H. y cols. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-1347 (updated in *Cell* 77:967-968.)
10. Hsiao, K.K. y cols. 1990. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein of Gerstmann-Strausler syndrome. *Science* 250:1587-1590.
11. Hsiao, K.K. y cols. 1994. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:9126-9130.
12. Pan, K.M. y cols. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10962-10966.
13. Cohen, F.E. y cols. 1994. Structural clues to prion replication. *Science* 264:530-531.