

# Fisiopatología de las enfermedades por priones

Alejandra Mandujano,<sup>a</sup> Saraí Montes,<sup>b</sup> Aída Guzmán,<sup>c</sup> Blanca Espinosa,<sup>d</sup> Daniel Rembao,<sup>b</sup> Salvador Martínez-Cairo,<sup>e</sup> Edgar Zenteno<sup>c</sup> y Jorge Guevara<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México, México

<sup>b</sup>Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas y Departamento de Neuropatología. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velazco Suárez, México D. F., México

<sup>c</sup>ENP 1 y Departamento de Bioquímica, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México

<sup>d</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Especialidades Respiratorias, México D. F., México

<sup>e</sup>División de Investigación, CMNS XXI, IMSS, México D. F., México

Recibido en su versión modificada: 17 de abril de 2006

Aceptado: 12 de mayo de 2006

## RESUMEN

Las enfermedades por priones, son trastornos neurodegenerativos progresivos rápidos e invariablemente fatales que afectan tanto a seres humanos como a animales. Tienen formas de presentación esporádica, genética e infecciosa. Los priones son proteínas celulares. No contienen ácidos nucleicos y no son virus o microorganismos. En todos los casos, provocan muerte neuronal, espongiosis común del cerebro, que caracteriza a estas enfermedades, así como agregación de la proteína amiloide prión en forma de placa. La teoría más importante hasta el momento, es la que trata de explicar el cambio de conformación de la proteína prión para producir copias de sí misma y para su agregación y la muerte de las neuronas. Sin embargo, nuevas formas de explicación toman auge actualmente. Una de las más importantes se basa en entender el contenido y cambio de la glicosilación de la proteína prión patológica. Esto permite explicar algunas de sus interacciones, para entender el cambio de conformación y las propiedades físico-químicas de la proteína. Así como algunas de las primeras funciones biológicas (como transportador de iones  $\text{Cu}^{++2}$ ) descritas para esta molécula. En esta revisión abordamos todos los tópicos importantes acerca de estas patologías por demás fascinantes.

## Palabras clave:

Prión, enfermedades por priones, glicosilación, cerebro

## SUMMARY

Prion diseases are a group of degenerative disorders characterized by being progressive, fast growing, and fatal, they affect humans and animals. Due to their physiopathogeny, these disorders can be sporadic, genetic, or infectious. Prions are cellular proteins that lack nucleic acids; they are not viruses or microorganisms. Prions induce neuronal death, brain spongiosis, which are a hallmark of these diseases, as well as amyloid prion protein plaque aggregates. Although the causes that favor pathogenic prion proteins remain uncertain, it is possible that conformational changes of the prion protein allow them to create copies of themselves to form aggregates and induce neuronal death. Other theories suggest that quantitative and qualitative changes in the glycosylation pattern induce the pathological prion form. The latter allows to explain some of their interactions and to understand better the conformational changes and the physico-chemical properties of the prion protein. We review some of the first biological functions (as a transporter of  $\text{Cu}^{2+}$  ions) that have been described to this molecule. The present review focuses on different aspects of prion diseases aimed at understanding better their physiopathogenic characteristics.

## Key words:

Prion, prion diseases, glycosylation, brain

## Enfermedades causadas por priones

Antes conocidas como Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), las enfermedades causadas por priones o prionopatías (EPRs), son trastornos neurodegenerativos progresivos e invariablemente fatales que afectan tanto a seres humanos como a animales.<sup>1,2</sup> Estas presentan formas etiológicas distintas: hereditarias, esporádicas y, a diferencia del resto de las enfermedades neurodegenerativas reportadas hasta ahora, también formas infecciosas. Los tiempos de incubación de las EPRs son muy variables, desde unos cuantos meses hasta años, o incluso, décadas.<sup>3,4</sup> En los humanos, las prionopatías presentan un cuadro patológico

que incluye ataxia, temblor generalizado, pérdida de coordinación, alteraciones de memoria, disfunción motora, pérdida de las habilidades cognitivas, demencia progresiva e invariablemente, la muerte.<sup>3,5</sup> En este tipo de padecimientos se encuentran la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), el Insomnio Familiar Fatal (IFF), la Angiopatía Amiloide Cerebral causada por Priones (AAC-PRP), el kuru y una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvECJ)<sup>2,3</sup> (Cuadro I). En los animales, los priones provocan las Encefalopatías Espongiformes del ganado Bovino (EEB) —mejor conocida como “enfermedad de las vacas locas”—, encefalopatías del ganado ovino, caprino, de ungulados como el venado y el

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Jorge Guevara, Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez. Insurgentes Sur 3877, La Fama, 14269 Tlalpan, México D.F., México. Correo electrónico: jguevara@inn.edu.mx

alce, así como de felinos silvestres y domésticos. También causan la forma más común de este tipo de enfermedades, que es el "scrapie" o prurito lumbar en ovejas y cabras.<sup>3,6</sup> Los animales afectados pierden la coordinación motora hasta el punto en que les es imposible ponerse de pie, se tornan irritables y en algunos casos, sufren de un prurito intenso. Los síntomas por lo general se intensifican progresivamente y culminan con la muerte del animal en el transcurso de un año.<sup>6</sup>

### Características de las enfermedades causadas por Priones

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob fue descrita por primera vez en 1920 por H.G. Creutzfeldt y A. Jakob, y fue la primera EPRs reportada en humanos. En la mayoría de los casos, se presenta de forma esporádica;<sup>7,8</sup> únicamente es hereditaria en 10 a 15% de los afectados, y han sido reportadas infecciones transmitidas por transplantes de córnea, implantes de duramadre, uso de electrodos cerebrales e instrumentos quirúrgicos contaminados así como por inyección de hormonas del crecimiento obtenidas de glándulas hipofisarias humanas.<sup>3,6</sup> La incidencia anual de la ECJ, que es la EPRs más frecuente, es de uno a dos casos por millón de personas.<sup>9,10</sup> En 1936, J. Gerstmann, E. Sträussler e I. Scheinker describieron el síndrome que lleva sus nombres. El *síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker* es la única EPRs que se transmite exclusivamente de forma hereditaria, debido a mutaciones puntuales con carácter autosómico en el gen que codifica para la proteína prión. Se ha propuesto, que la sustitución de un aminoácido por otro en la secuencia de dicha proteína, altera su estabilidad termodinámica en el medio celular, lo cual favorece el cambio conformacional que le confiere su carácter patológico.<sup>3,11</sup>

El IFF es una enfermedad caracterizada por trastornos progresivos del sueño, y de los sistemas endocrino y muscular que culminan con la declinación cognoscitiva, pérdida de la independencia funcional y la muerte.<sup>9</sup> La enfermedad fue reportada desde 1939 pero se describió por primera vez en 1986 en un individuo de 53 años de edad que se presentó

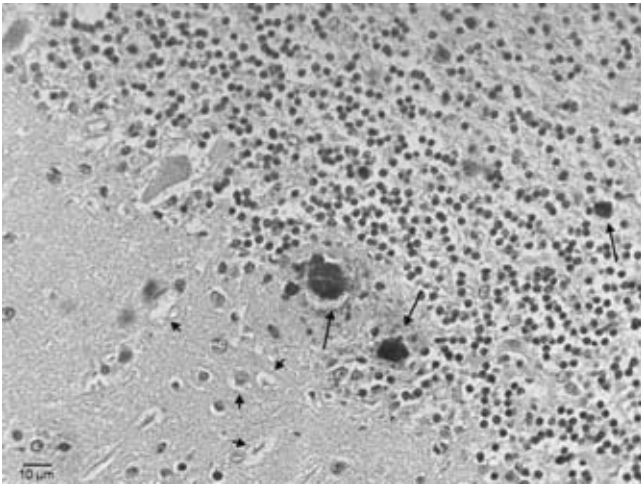
con insomnio progresivo.<sup>3,10</sup> E. Lugarest, R. Medori y P. Gambeti acuñaron el nombre del padecimiento refiriéndose al síntoma más característico y a que todos los casos reportados hasta entonces eran hereditarios. Sin embargo, recientemente ha sido identificada una EPRs de carácter esporádico con características clínicas y neuropatológicas muy similares a las del IFF, aunque aún no se ha corroborado que se trate de la misma enfermedad.<sup>9,10</sup> La AAC-PRP se distingue por presentar, además de la proteína prión anómala, lesiones neuronales ocasionadas por la proteína tau, similares a las que se presentan en la enfermedad de Alzheimer (EA). Consiste en un nuevo fenotipo de la enfermedad de GSS y se ha asociado también a mutaciones puntuales del gen que codifica para la proteína prión. Sin embargo, hasta el momento ha sido reportado un caso, lo que dificulta la realización de otros estudios al respecto.<sup>12</sup>

Vincent Zigas y Carleton Gajdusek describieron el kuru en 1957, es una EPRs endémica de los miembros de la tribu Fore de las islas de Papúa de Nueva Guinea. Estudios epidemiológicos sugieren que el kuru era transmitido mediante la ingestión de los cadáveres de familiares en un ritual religioso, afectando mayoritariamente a mujeres y niños de ambos sexos que consumían el tejido cerebral.<sup>10,13</sup> El cese del canibalismo en la década de 1950 propició la desaparición casi total de la enfermedad, hecho que evidencia el papel del endocanibalismo en la transmisibilidad del kuru. Los individuos afectados sufrían de cefalalgia y dolor articular, síntomas que precedían a la disfunción cerebelosa caracterizada por dificultad para caminar, pérdida de la coordinación motriz y temblores generalizados. La muerte ocurría en el transcurso de uno a dos años después de la presentación de los síntomas.<sup>10,14</sup>

En 1996, con el estudio de 10 casos de una nueva prionopatía, expertos del Ministerio de Salud del gobierno de Gran Bretaña informaron que el agente etiológico de la EEB ("enfermedad de las vacas locas") se había extendido a los humanos. El surgimiento de una nueva variante de la ECJ probablemente esté relacionado con la ingestión de tejido nervioso, muscular o de médula ósea de ganado infectado. Algunos trabajos experimentales han evidenciado la rela-

**Cuadro I. Características de las Enfermedades causadas por Priones que afectan al humano**

EPRs	Etiología	Inicio	Síntomas	Epidemiología
ECJ	Hereditaria; 15% esporádica; resto infección	70 años. Duración: alrededor de 1 año	Ataxia, mioclonías, demencia, fatiga e insomnio.	Esporádica: 1/millón. Hereditaria: aprox. 100 familiar.
Kuru	Infecciosa, por canibalismo (cesó en 1958)	Variable. Duración: 3 meses-1 año	Pérdida de coordinación, dismetría, hipotonía, labilidad emocional, demencia	Papúa, Nueva Guinea. Tribu Fore: 2600 casos (1957)
IFF	Hereditaria; esporádica (mutación en PRNP)	48 años. Duración: ~1 año	Trastornos progresivos del sueño, trastornos motrices	9 familias identificadas.
AACPrP	Hereditaria; mutación en el gen PRNP	38 años. Duración: 21 años	Alteraciones de memoria, desorientación, ataxia, parálisis ligera-espasmódica	1 caso.
GSS	Hereditaria; mutación en el gen PRNP	40-60 años. Duración: 1-16 años	Ataxia, demencia cortical global, mioclonías, parálisis agitantes	2 casos/100 millones, ± 50 familias.
nvECJ	Infecciosa	28 años. Duración: ~1 año	Cambios en el carácter, ansiedad, depresión, demencia	38 casos confirmados (1999).



**Figura 1.** Neuropatología de las EPRs. Microfotografía del cerebelo de un individuo con enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (40X). Depósitos de la proteína prión anómala (Flechas) donde son notables los cambios espongiiformes (puntas de flecha). Inmunohistoquímica contra el segmento 27-30 KDa de la proteína prión revelado con la técnica de peroxidasa.

ción entre el agente causal de la EEB y la nvECJ, mediante la transmisión exitosa de la EEB a primates no humanos, encontrándose una estrecha similitud de sus perfiles neuropatológicos.<sup>10,15</sup> Las características clínicas de la nvECJ que difieren de la ECJ clásica incluyen: edad de inicio más temprana, duración más prolongada, cambios conductuales frecuentes y tempranos, así como la ausencia de las anomalías electroencefalográficas típicas de la ECJ.<sup>9,10</sup>

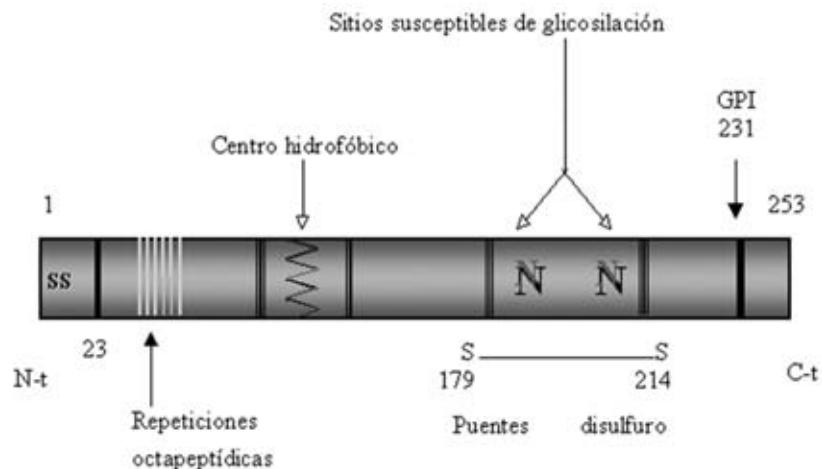
Las EPRs presentan características neuropatológicas similares: pérdida neuronal, que le confiere al cerebro un aspecto espongiiforme debido a los espacios que quedan en el tejido; formación anómala de gran cantidad de vacuolas intraneuronales de 20-200  $\mu\text{m}$  de diámetro en cualquier capa de la corteza cerebral;<sup>16</sup> presencia de cúmulos de células de la glía y de astrocitos que aumentan de tamaño como reacción al daño neuronal (astrogliosis);<sup>6</sup> ausencia de reacción inflamatoria y de respuesta inmunológica y, finalmente, acumulación de depósitos de la proteína prión anómala.<sup>9,17</sup> La presencia y magnitud de estas características varían en cada tipo de EPRs y en cada caso<sup>4,17</sup> (Figura 1). Existe además una activación astrocítica abundante y daño pre-inflamatorio.<sup>58</sup> Sin embargo, los datos histopatológicos no han sido consistentes.<sup>59</sup> Evidencia reciente demuestra que la patología por priones tiene una respuesta inflamatoria altamente atípica, caracterizada por la activación de las poblaciones de macrófagos en el cerebro. Esto sugiere que una inflamación sistémica podría impactar en la inflamación local en el cerebro dañado y exacerbando la síntesis de citoquinas inflamatorias u otros mediadores en el cerebro y que podrían contribuir al proceso crónico degenerativo.<sup>60</sup>

La proteína prión normal está distribuida de manera homogénea en todos los tejidos humanos. Sin embargo, en particular en la nvCJD, se ha mostrado que la acumulación anormal de la proteína se da, principalmente, en el tejido linfóide huésped, en particular en las células dendríticas

foliculares.<sup>55</sup> Cuando la neuroinvasión ocurre, se presenta por dos vías neuronales diferentes (vago y nervios esplénicos) y precede usualmente, a la propagación en órganos linfoides secundarios. Aunque otras formas etiológicas de la PrP<sup>Sc</sup> (Proteína >>Prión Scrapie) aparentemente están limitadas al SNC.<sup>54</sup> Así mismo, estudios longitudinales en modelos experimentales de scrapie, indican que los cambios neuropatológicos (activación glial y degeneración de las neuronas) están presentes antes de que aparezcan los síntomas y están topológicamente relacionados con el depósito de PrP<sup>Sc</sup>.<sup>54</sup> Sin embargo, queda abierta la interrogante de la aparición de la nvCJD, que en un principio se atribuyó al consumo de carne contaminada (vacas locas). Se ha sugerido, basándose en estudios con modelos animales, que la progresión de la infección al SNC es gradual, llegando hasta los niveles máximos durante la enfermedad. Por otra parte, reportes recientes sugieren que la nvCJD pudiera tener una transmisión iatrogénica. Ya sea por cirugía, transfusión sanguínea, o un trasplante de los órganos de un donador en fase pre-clínica de una enfermedad por priones.<sup>55</sup> Los datos más recientes al respecto indican, que las transfusiones sanguíneas pudieran ser el vínculo directo. Esta noticia ha causado revuelo en la comunidad médica y científica.<sup>56,57</sup> Al menos dos casos se han reportado. En uno, el paciente murió por causas ajenas a una neurodegeneración.<sup>57</sup> El paciente había recibido cinco años antes una transfusión sanguínea de un donador que desarrolló la nvCJD. La proteína prión se encontró en el primer paciente en varios órganos excepto en el cerebro (fase preclínica). La particularidad del caso fue que el paciente era además heterocigoto para el codón 129. Estos datos abren al menos dos posibilidades de prevención: una, se debe evitar y descartar como donadores de sangre a aquellas personas que hayan sido transfundidas alguna vez en su vida; y dos, que además de las condiciones de infección, existe una susceptibilidad genética para adquirir la nvCJD.<sup>57</sup>

### *La biología molecular de los priones*

Utilizando técnicas de Biología Molecular se logró determinar la naturaleza del agente etiológico de las EPRs. Dado el carácter infeccioso de dicho agente, se supuso que este debía contener al menos un tipo de ácido nucleico. Según el dogma central de la Biología Molecular, de estas biomoléculas depende la única forma viable de reproducción. Sin embargo, al determinarse la carencia de ácidos nucleicos en su estructura, fue propuesto el término "prión", apócope de *proteinaceous infectious particle* para designar a la partícula cuyo único componente conocido como agente etiológico es una proteína.<sup>18,19</sup> Se ha sugerido que las EPRs son causadas por la modificación post-traduccional de la Proteína Prión Celular (PrP<sup>C</sup>)—que es una proteína que se encuentra en las células neuronales de forma natural—, mediante un cambio de conformación de la estructura terciaria, resultando una isoforma patológica denominada PrP<sup>Sc</sup>.<sup>20</sup> La ausencia de respuesta inmune contra el prión y la presencia del gen que codifica para esta proteína en el genoma del hospedero, confirmaron que el agente causal es una forma anormal de una proteína normal del organismo.<sup>6</sup> Este descubrimiento se contrapone al principio biológico que establece que la secuencia de aminoácidos



**Figura 2.** Representación lineal de las principales regiones de la hPrP<sup>C</sup>. N-t; extremo amino terminal, C-t; extremo carboxilo terminal, SS; secuencia señal, N; asparagina, S; cisteína.

de una proteína determina de manera unívoca el plegamiento o estructura terciaria de esta, porque en la actualidad se conoce que existen al menos dos isoformas de la proteína príon cuyas estructuras son termodinámicamente estables como para mantenerse en condiciones fisiológicas.<sup>11</sup> Además, no han sido encontradas diferencias químicas con excepción de los casos hereditarios, ni de estructura covalente entre ambas isoformas.<sup>21,22</sup>

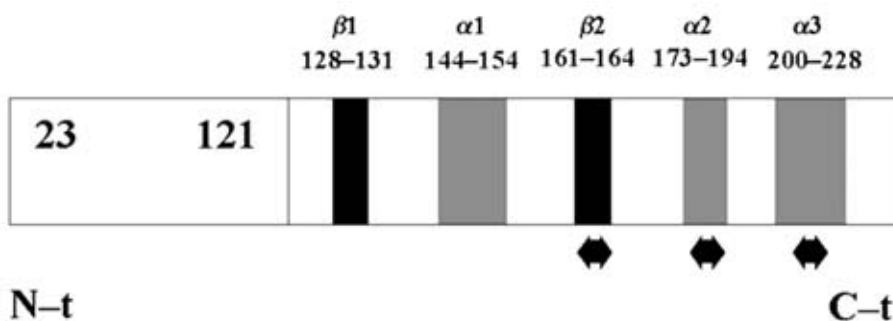
La PrP<sup>C</sup> se codifica por un único gen llamado PRNP presente en los mamíferos, aves e incluso en los reptiles;<sup>1,23</sup> la secuencia de aminoácidos se ha mantenido en la escala filogenética. Se presenta en tejido nervioso, muscular y en células del sistema inmunitario.<sup>24</sup> La mayor concentración de PrP<sup>C</sup> ha sido reportada en las neuronas, particularmente en las membranas pre y post-sinápticas, lo que sugiere que posee importancia en el funcionamiento de éstas,<sup>23</sup> sin embargo, su función específica no ha sido dilucidada aún.<sup>25</sup> Mediante un proceso hasta el momento desconocido, la PrP<sup>C</sup> cambia su conformación espacial y se convierte en una forma anómala PrP<sup>Sc</sup> que no cumple ninguna función en la célula y cuya presencia es causa de patología. Los mecanismos que intervienen en las manifestaciones clínicas y neuropatológicas de las EPRs tampoco son conocidos. Únicamente existe evidencia de que la PrP<sup>Sc</sup> ejerce efectos tóxicos sobre las neuronas que pueden conducir a la muerte mediante apoptosis. La presencia de gran cantidad de vacuolas intraneuronales se debe a la división de la tricapa lipídica de las membranas neuronales, modificación probablemente relacionada con el hecho de que PrP es una proteína integral de dichas membranas.<sup>9</sup> La acumulación de astrocitos reactivos y de células de la glía hipertróficas probablemente sea consecuencia del daño neuronal.<sup>6</sup>

La proteína príon celular humana (hPrP<sup>C</sup>) —que consta de 253 aminoácidos— es sintetizada en los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) y es translocada de manera cotraduccional al interior de este organelo debido a la acción de una secuencia señal constituida por los primeros 22 aminoácidos del extremo amino terminal (N-terminal) de la

proteína.<sup>26</sup> Una vez dentro del RE, el procesamiento postraduccional normal incluye la eliminación proteolítica de la secuencia señal (aminoácidos 1-22) y la eliminación de 22 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal (C-terminal). Posteriormente, le son adicionadas una o dos cadenas de oligosacáridos conocidas como glicosil-fosfatidilinositol (GPI), probablemente en la serina número 231.<sup>9,27</sup> El GPI se une covalentemente a los lípidos de la membrana plasmática de las células de manera que la proteína queda expuesta al medio extracelular. Cerca del extremo N-terminal se encuentra una región que contiene 4 repeticiones del octapéptido PHGG(G/S)WGQ, rico en residuos prolina y glicina (entre los residuos 60 y 93) y una secuencia homóloga que ha perdido un residuo de histidina PQGGGGWGQ (entre los residuos 52 y 60), posteriormente se encuentra una zona rica en aminoácidos hidrofóbicos. Existen dos sitios susceptibles de glicosilación, particularmente de N-glicosilación, en las Asparaginas 181 y 197. Además, los residuos 179 y 214 están unidos mediante un enlace disulfuro<sup>28</sup> (Figura 2).

Estudios realizados mediante Resonancia Magnética Nuclear muestran que la hPrP<sup>C</sup> posee un dominio globular que se extiende desde el aminoácido 125 hasta el 228. En este dominio se forman tres estructuras  $\alpha$ -hélice en los residuos 144-154, 173-194 y 200-228, así como dos dominios de láminas  $\beta$ -plegada de los residuos 128-131 y 161-164. Existen tres zonas de irregularidad estructural, la primera es un asa constituida por los aminoácidos 167-171, la segunda comprende a los aminoácidos 187-194 y la tercera, a los residuos 219-228<sup>29</sup> (Figura 3).

Pese a los avances logrados en el conocimiento de la forma celular de la proteína príon de varios organismos, la biología celular y la estructura de la forma patológica PrP<sup>Sc</sup> aún se desconocen. Han logrado diferenciarse en la práctica debido a que ambas isoformas difieren notablemente en sus propiedades químicas y fisiológicas.<sup>6</sup> La PrP<sup>C</sup> está compuesta por 42% de estructuras  $\alpha$ -hélice y un 3% de láminas  $\beta$ -plegada. Es un monómero presente en la superficie celular, sensible a la digestión por proteasas y soluble en detergentes.



**Figura 3.** Modelo lineal de las regiones que conforman el segmento globular de PrP<sup>c</sup> de humano (23-252), indicando la posición de las estructuras  $\alpha$ -hélice ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\alpha 3$ ), láminas  $\beta$ -plegada ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) y las regiones de irregularidad estructural (flechas bidireccionales).<sup>11</sup>

tes.<sup>30</sup> Se ha determinado que la PrP<sup>Sc</sup> está formada por un 43% de láminas  $\beta$ -plegada y 30% de  $\alpha$ -hélice.<sup>30</sup> Es una proteína que tiende a agregarse para formar oligómeros insolubles, es parcialmente resistente a la degradación por proteasas e insoluble en presencia de detergentes.<sup>31</sup>

### Teorías del cambio conformacional de los priones

Evidencias experimentales han probado que el evento fundamental y probablemente, causal, de las EPRs es el cambio conformacional de la PrP<sup>c</sup> a la proteína prión anómala o "scrapie" PrP<sup>Sc</sup><sup>32</sup> por lo que, en la actualidad, la mayoría de las investigaciones sobre la etiología de las EPRs se han centrado en la elucidación de este fenómeno. La conversión de PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> es un evento postraducciona que ocurre después de que la proteína "normal" PrP<sup>c</sup> ha alcanzado su posición en el dominio extracelular de las membranas neuronales, o incluso, mucho después, durante el transporte vesicular de la proteína al interior de la neurona.<sup>1</sup> Debido a la existencia de distintos mecanismos de adquisición de las EPRs –hereditario, esporádico e infeccioso– se han propuesto varias teorías que pretenden explicar el cambio conformacional, y se mencionan a continuación.

### Desestabilización de la PrP<sup>c</sup> debida a mutaciones del gen PRNP

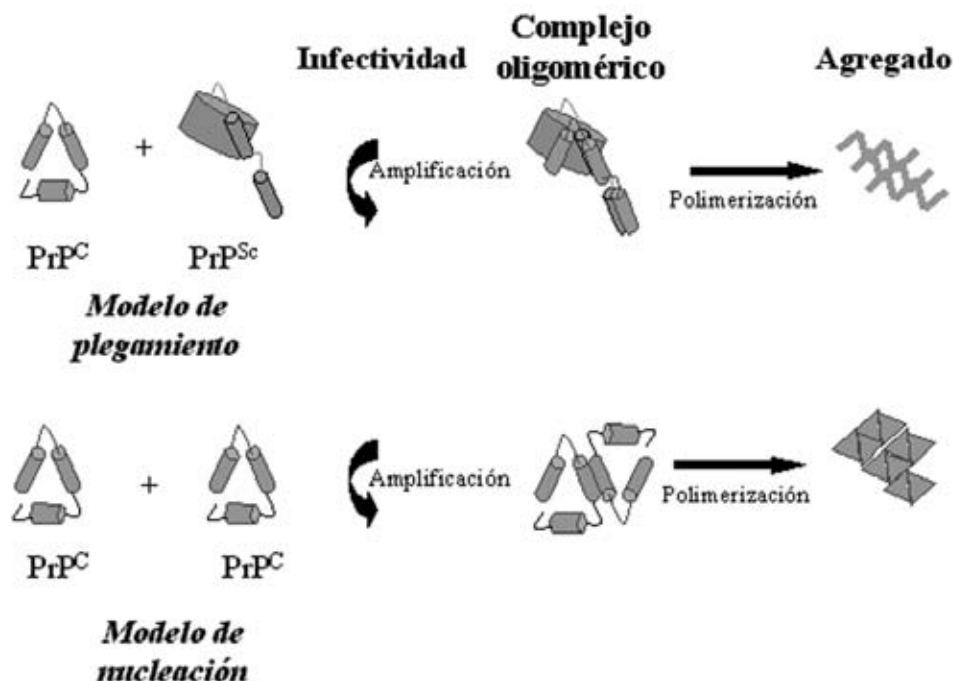
Las variantes hereditarias de las EPRs se deben a mutaciones puntuales del gen PRNP que se manifiestan en la sustitución de un aminoácido por otro en la PrP,<sup>33</sup> o por la inserción de repeticiones de aminoácidos en múltiplos de ocho.<sup>3,34</sup> Stanley Prusiner sugiere que la presencia de aminoácidos incorrectos podría desestabilizar la estructura terciaria de la proteína, principalmente, en los dominios  $\alpha$ -hélice, aumentando la posibilidad de que la hélice afectada y sus vecinas se plieguen nuevamente constituyendo estructuras en lámina  $\beta$ -plegada.<sup>6</sup> En la actualidad, están caracterizadas alrededor de 30 mutaciones en familias con EPRs heredadas,<sup>10</sup> sin embargo, únicamente 10% de los casos reportados de EPRs son de origen hereditario, por lo que la vasta mayoría son esporádicas e infecciosas y no presentan algún tipo de mutación en el gen, ni alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína.<sup>6</sup> Por esta razón,

esta teoría no está lo suficientemente argumentada como para explicar el cambio conformacional de 90% de los casos.<sup>11</sup> Para probar la validez de esta teoría en las EPRs hereditarias, se ha estudiado la estabilidad termodinámica de ocho diferentes PrP<sup>c</sup> cuya secuencia difiere únicamente en un aminoácido. Se ha demostrado que estas mutaciones puntuales están asociadas a EPRs, pero se demostró que ningún cambio de amino ácidos causa la inestabilidad suficiente para provocar el cambio de conformación característico de la PrP<sup>Sc</sup>, por lo que se sugiere que la desestabilización de la PrP<sup>c</sup> no es el mecanismo causal de la formación de la isoforma patológica en las variantes hereditarias.<sup>11</sup>

### Interacciones moleculares entre PrP<sup>c</sup> y PrP<sup>Sc</sup>

Esta teoría incluye dos modelos de explicación: El primero se denomina *Modelo de Nucleación*. Sugiere que la isoforma "normal" PrP<sup>c</sup> se encuentra en equilibrio conformacional con la isoforma patológica PrP<sup>Sc</sup> o con un precursor de esta. Aunque la estructura de PrP<sup>c</sup> es favorecida, el cambio conformacional es un proceso estocástico que ocurre cuando unas cuantas moléculas de conformación anormal actúan como una semilla o núcleo capaz de inducir el cambio masivo de moléculas normales en moléculas con la conformación anómala<sup>19,34</sup> y es el resultado de interacciones directas entre la PrP<sup>c</sup> y la PrP<sup>Sc</sup>.<sup>18</sup> Una vez que se inicia la transformación, ésta se propaga como una reacción en cadena, y debido a la insolubilidad que caracteriza a las moléculas de PrP<sup>Sc</sup>, éstas se depositan en el citoplasma neuronal formando extensos agregados que dañan a las células.<sup>19,30</sup> El proceso se asemeja al fenómeno de nucleación de los cristales, en el que una vez presente el cristal "semilla", la agregación es ampliamente favorecida y ocurre de manera relativamente rápida.<sup>1</sup> Estudios realizados por Come y cols. y por Glover y cols., en péptidos basados en secuencias de proteínas prión y en el factor de la levadura [PSI<sup>+</sup>] respectivamente, han demostrado que el mecanismo de conversión de los priones y la formación de agregados es dependiente del proceso de nucleación<sup>16,35,36</sup> (Figura 4).

El segundo, *Modelo de Plegamiento*, propone que la conversión de la PrP<sup>c</sup> requiere que esta se encuentre desplegada y que se vuelva a plegar de manera anormal bajo la influencia de una molécula de PrP<sup>Sc</sup>.<sup>37</sup> Este proceso



**Figura 4.** Esquema de las dos teorías que supone que las interacciones moleculares entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup> son la base del cambio conformacional de los priones (Modificado de Masters and Beyreuther, 1997, Ref. 16).

requiere franquear una barrera energética muy grande.<sup>1,38</sup> La presencia de la PrP<sup>Sc</sup> que iniciaría este proceso sería debida a la infección o a la transformación esporádica de moléculas PrP<sup>C</sup>.<sup>39</sup> Este modelo ha sido apoyado al reportarse que en estudios *in vitro* la PrP<sup>C</sup>, conformada mayoritariamente por estructuras  $\alpha$ -hélice, es capaz de cambiar espontáneamente de conformación hacia estructuras  $\beta$ -plegada que constituyen la PrP<sup>Sc</sup>.<sup>9,40</sup> (Figura 4). Como implicación inmediata de estos dos modelos de explicación del cambio conformacional, se intuye que es necesaria la presencia de la PrP<sup>C</sup> en el hospedero para que pueda ser establecida una infección; esto fue corroborado por Prusiner en 1982, al demostrar la resistencia de ratones con el gen PRNP suprimido, y que por lo tanto, no producían PrP<sup>Sc</sup> al ser infectados por scrapie.<sup>6</sup>

### Procesos postraduccionales

Debido a que no se han encontrado diferencias químicas entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup>, se presume la existencia de otros procesos implicados en el cambio conformacional y en la agregación de la PrP. Esto permite explicar la patología de las prionopatías a través de las modificaciones postraduccionales de la PrP. Un proceso similar se estudia ya en la EA, donde se ha observado la importancia que tienen los procesos postraduccionales de las proteínas involucradas que se agregan y se vuelven insolubles, la proteína tau y amiloide- $\beta$ .<sup>41,42</sup> Al parecer, tanto en la EA y en las enfermedades por priones existen mecanismos comunes en la agregación e insolubilidad de las proteínas. Una proteína no es biológicamente activa hasta que adquiere la conformación plegada

nativa, determinada por su secuencia de aminoácidos. La cadena polipeptídica adopta espontáneamente, durante o después de su síntesis, dicha conformación. De este modo, el mensaje genético lineal del que es portador el ARN mensajero, se convierte en una estructura tridimensional específica del nuevo polipéptido sintetizado. Sin embargo, en muchos casos es necesario que la cadena polipeptídica —recién sintetizada— experimente una modificación postraducciona. Finalmente, la proteína adopta su conformación nativa respectiva. A estos cambios, se les denomina modificaciones postraduccionales y dependen de la naturaleza de la proteína. Uno de los mecanismos postraduccionales de mayor importancia en la fisiopatogénesis de las EETs, es la glicosilación.

### Glicosilación de la PrP<sup>C</sup>

La glicosilación consiste en la adición covalente de oligosacáridos a las proteínas y lípidos de manera enzimática y donde los carbohidratos quedan como cadenas laterales. Las proteínas glicosiladas o glicoproteínas tienen funciones importantes en membranas, lisosomas y en el espacio extracelular, participando principalmente como moléculas de reconocimiento celular. En contraste, pocas proteínas del citosol se encuentran glicosiladas.

Las glicoproteínas contienen una o más cadenas de carbohidratos, que están clasificadas de acuerdo con el aminoácido al que se une el azúcar; tipo N-glicosídico si se enlaza sobre una asparagina (Asp), y del tipo O-glicosídico cuando la transferencia se realiza con serina (Ser) o treonina (Thr).

La PrP<sup>C</sup> posee dos sitios propicios para cadenas de N-oligosacáridos (en los residuos 180 y 196) y en el C-terminal (residuo 179). Los sitios son ocupados en forma variable, conformando cuatro glicofomas de la proteína, mismas que coexisten. Una está doblemente glicosilada, dos monoglicosiladas y una no glicosilada.<sup>43</sup> Los oligosacáridos que están unidos a la PrP<sup>C</sup>, son N-oligosacáridos, establecen formas ortogonales, con carga negativa. Éstos cubren a la proteína impidiendo, por efecto estérico, las interacciones intramoleculares o intermoleculares. El hecho que la PrP contenga tal variedad de complejos oligosacáridicos, sugiere que se modifican las propiedades que distinguen entre la PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup>. Sin embargo, células tratadas con un inhibidor de la glicosilación, como la tunicamicina, produjeron especies simples de la PrP no glicosiladas, pero resistentes a proteasas. En este experimento se concluyó que la N-glicosilación no es esencial para la síntesis de la PrP resistente a proteasas. Sin embargo, no hay evidencia de que las moléculas de PrP<sup>Sc</sup> no glicosiladas se asocien a la infectividad en las enfermedades por priones. Por otra parte, los modelos propuestos de la PrP<sup>C</sup>, indican sitios probables de unión para la proteína X. Esto indica que la presencia de las cadenas de carbohidratos no constituye un impedimento para la asociación entre la PrP<sup>C</sup> y la proteína X teórica propuesta. Aunque en estos modelos aparece un número importante de sitios posibles para la O-glicosilación, no se han detectado O-glicanos en la PrP<sup>C</sup> de hámster. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado la existencia de residuos O-glicosilados en los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en el síndrome de GSS.<sup>17</sup> Hasta el momento se ha sugerido que las modificaciones postraduccionales que pudieran dar lugar al cambio conformacional de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> son producto de la N-glicosilación.<sup>44-46</sup> La O-glicosilación no ha sido tomada en cuenta para explicar la transformación de la PrP, ya que en las fracciones aisladas, tanto de PrP<sup>C</sup> como de PrP<sup>Sc</sup>, no se han encontrado este tipo de cadenas de carbohidratos. Por la dificultad para purificar fracciones de ambas isoformas de la PrP, y por la degradación, es factible suponer que los carbohidratos O-glicosilados pudieran estar presentes en la proteína príon y que no hayan sido detectados.<sup>46</sup> Chen y cols. evaluaron los efectos que puede tener la adición de carbohidratos O-glicosilados al fragmento 108-144 de la proteína príon. Observaron que la adición de  $\alpha$ -GalNAc en la Serina 135 evita la formación de agregados fibrilares, no así el carbohidrato  $\beta$ -GlcNAc que incluso potencia la agregación fibrilar del péptido, al igual que el  $\alpha$ -GalNAc pero en la serina 132.<sup>46</sup>

## Posibles funciones de los priones

Las funciones biológicas de PrP<sup>C</sup> permanecen poco claras hasta ahora. Sin embargo, dado que su secuencia aminoacídica es altamente conservada entre especies, se sugiere que posee especial importancia en procesos fisiológicos. Se ha reportado que PrP<sup>C</sup> liga iones de cobre y que este estimula la endocitosis de la PrP<sup>C</sup> desde la superficie celular de manera rápida e irreversible.<sup>47,48</sup> Esto abre la posibilidad de que la PrP<sup>C</sup> funcione como receptor celular de Cu<sup>++</sup>.<sup>23</sup> Se ha propuesto también que PrP<sup>C</sup> actúa como transductor de señales intracelulares para la protección neuronal, en este

proceso de señalización están involucradas moléculas como el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y fosfocinasas. La señal generada estuvo ausente en ratones carentes del gen PRNP.<sup>49</sup> Otros estudios sugieren que la proteína príon está involucrada en el fenómeno de potenciación a largo plazo, en procesos fisiológicos del sueño y en mecanismos de adhesión célula-matriz extracelular.<sup>49-51</sup>

## Alternativas terapéuticas experimentales

Durante los últimos 30 años se han usado más de 60 compuestos diferentes para tratar animales infectados experimentalmente. La especulación actual acerca de la importancia de la estructura química que pueda tener tanto una fase soluble en agua y una lipídica, podría tener aplicación directa para impedir el ensamble erróneo de la proteína príon en la membrana celular.<sup>52</sup> Los compuestos que reducen la acumulación de PrP<sup>Sc</sup> en modelos celulares en cultivos infectados, incluyen compuestos polianiónicos, rojo Congo, anfotericina B, porfirinas y derivados de fenotiazidas como la quinacrina.<sup>53</sup> Sin embargo, estas drogas han demostrado ser útiles solamente en animales infectados periféricamente (después de la infección intraperitoneal) y antes de la invasión neuronal. Hay dos excepciones, el Polisulfato de Pentosan y la anfotericina que inyectados intraventricularmente en ratones que fueron infectados intracerebralmente, retardan el inicio clínico cuando se administran en el curso tardío de la infección.<sup>53</sup> Algunos tratamientos inmunológicos se han probado de igual forma. Se ha tratado a los animales de experimentación con inmunidad pasiva y activa. Ejemplos concretos han demostrado que el uso de ciertos epítopes de PrP inhibe la propagación de PrP<sup>Sc</sup> en cultivos celulares. En ratones transgénicos con el gen PRNP, se ha logrado una protección periférica, pero no central, contra la infección por priones. Algunos otros intentos se han realizado usando ingeniería genética, han sido alentadores y podrían neutralizar la infección *in vivo*.<sup>53</sup> Sin embargo, los compuestos más efectivos contra la infección, probados hasta el momento, deben ser administrados al mismo tiempo que la infección se produce o en un plazo inmediato. Por lo que estas patologías siguen siendo incurables hasta el momento.<sup>54</sup>

## Conclusión

Las enfermedades causadas por priones son, por múltiples razones, patologías sin precedente. Son enfermedades neurodegenerativas de carácter esporádico, infeccioso y hereditario; el mecanismo de transmisión de éstas contradice el Dogma Central de la Biología Molecular ya que el agente etiológico es capaz de replicarse a sí mismo en ausencia de ácido nucleico, y además, viola el principio biológico que establece que la secuencia de aminoácidos de una proteína determina de manera unívoca el plegamiento o estructura terciaria de ésta. La generación de estos nuevos conocimientos fue motivo del otorgamiento de dos premios Nobel; al doctor Carleton Gajdusek en 1976 por haber demostrado la transmisibilidad del kuru, y al doctor Stanley Prusiner en 1997 por descubrir la naturaleza química del agente causal

de estas enfermedades. Sin embargo, el evento clave en el desarrollo de las EPRs, el cambio conformacional de la proteína prión, permanece en el ámbito de las hipótesis. De esta manera, se pone de manifiesto la necesidad de involucrar esfuerzos para la generación y rectificación de conocimiento concerniente a este fenómeno.

Proyecto apoyado parcialmente por CONACYT MO-334; FUNSLUD y PAPIIT-UNAM.

## Referencias

- Weissmann C. Molecular genetics of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *J Biol Chem* 1999;274:1:3-6.
- Weissmann C. The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* 2004;11:861-871.
- Belay ED. Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Ann Rev Microbiol* 1999;53:283-314.
- Bendheim PE, Bockman MP, McKinley MP, Kingsbury DT, Prusiner S. Scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins share physical properties and antigenic determinants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:997-1001.
- Kovacs GG, Kalev O, Budka H. Contribution of neuropathology to the understanding of human prion disease. *Folia Neuropathol* 2004;42 Suppl A: 69-76.
- Prusiner S. Novel Proteinaceous Infectious Particles cause Scrapie. *Science* 1982;216:136-144.
- Mallucci G, Collinge J. Update on Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Opin Neurol* 2004;6:641-647.
- Croes EA. Therapeutic approaches in treating Creutzfeldt-Jakob disease - what does the future hold? *Expert Opin Pharmacother* 2004;11:2391-2396.
- Coria BF. Demencias por priones. En: Alberca R, López Pousa YS. *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Médica Panamericana. España. 2002.*
- Weihl CC, Ross RP. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, nueva variedad de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, y la encefalopatía espongiiforme bovina. En: *Clínicas Neurológicas de Norteamérica. Infecciones del Sistema Nervioso Central. Vol. 4. McGraw-Hill Interamericana. México 1998.*
- Liemann S, Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited prion disease on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochem* 1999;38:3258-3267.
- Kitamoto T, Lizuka R, Tateishi YJ. An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:525-531.
- Liberski PP, Gajdusek DC. Kuru: Forty years later, a historical note. *Brain Pathol* 1997;7:555-560.
- Hainfellner JA, Liberski PP, Guiryo DC, Cervenakova L, Brown P, Gajdusek DC, et al. Pathology and Immunocytochemistry of a Kuru Brain. *Brain Pathol* 1997;7:547-553.
- Aguzzi A, Bitfler T, Klein M, Brandner S, Raeber A, Flechsig E, Weissmann C. Neurotoxicity and Neuroinvasiveness of prions. *Brain Pathol* 1997;7:1137-1138.
- Masters CL, Beyreuther K. Tracking turncoat prion proteins. *News and Views. Nature* 1997;388:228-229.
- Sánchez A, Guzmán A, Ortiz A, Rembao D, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J. Toluidine blue-O staining of prion protein deposits. *Histochem Cell Biol* 2001;116:519-524.
- Prusiner S. El prion en la patología. *Investigación y Ciencia. 1995; Marzo: 14-21.*
- Aranda A. Possible cell-free Prion replication. *Med Hypotheses* 1992;38:249-251.
- Tatzelt J, Winklhofer KF. Folding and misfolding of the prion protein in the secretory pathway. *Amyloid* 2004;3:162-172.
- Zhang H, Stockel J, Mehlhorn I, Groth D, Baldwin MA, Prusiner S, Lames TL, Cohen F. Physical studies of conformational plasticity in a recombinant Prion protein. *Biochem* 1997;36:3543-3553.
- Kuwata K, Li H, Yamada H, Legname G, Prusiner S, Akasaka K, James T. Locally disordered conformer of the hamster prion protein: A crucial intermediate to PrP<sup>Sc</sup>? *Biochem* 2002;41:12277-12283.
- Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends of Neuroscience* 2001;24:85-90.
- Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M. A cellular form of prion protein (PrP<sup>C</sup>) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol* 1995;76:2583-2587.
- Brookes J. Topics in prion cell biology. *Current Opinion in Neurobiol* 1999;9:571-577.
- Hölscher C, Bach UC, Dobberstein B. Prion Protein Contains a Second Endoplasmic Reticulum Targeting Signal Sequence Located at its C Terminus. *J Biol Chem* 2001;276:13388-13394.
- Stahl N, Baldwin MA, Burlingame A, Prusiner S. Identification of Glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochem* 1990;29:8879-8884.
- Nandi PK, Leclerc E, Marc D. Unusual property of prion protein unfolding in neutral salt solution. *Biochem* 2002;41:11017-11024.
- Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, Von Schroetter C, López F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K. NMR solution structure of human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;97:145-150.
- Pan KM, Baldwin MA, Nguyen J, Gassey M, Serban A. Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10962-10966.
- Bell JE, Ironside JW. Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. *Brain Med Bull* 1993;49:738-777.
- DeBurman S, Raymond G, Caughey B, Lindquist A. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13938-13943.
- Cohen FE. Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* 1999;293:313-320.
- Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol* 2004;10:1302-1306.
- Castilla J, Hetz C, Soto C. Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr Mol Med* 2004;4:397-403.
- Jarrett J, Lansbury PT. Seeding "One-Dimensional crystallization" of amyloid A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and Scrapie? *Cell* 1993;73:1055-1058.
- Georgieva D, Koker M, Redecke L, Perbandt M, Clos J, Bredehorst R, Genov N, Betzel C. Oligomerization of the proteolytic products is an intrinsic property of prion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1278-1286.
- Gasset M. El prion, una herejía científica en la vida cotidiana. *Fronteras de la Ciencia y Tecnología (Francia)* 1996;13:4-6.
- Satheeshkumar KS, Murali J, Jayakumar R. Assemblages of prion fragments: novel model systems for understanding amyloid toxicity. *J Struct Biol* 2004;148:176-193.
- Kocisko A, Come H, Priola A. Cell free formation of protease resistant prion protein. *Nature* 1994;370:471-474.
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vázquez L, Luna J, Perry G, Mena R. Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:905-914.
- Espinosa B, Guevara J, Hernández P, Slomianny MC, Guzmán A, Martínez-Cairo S, Zenteno E. Characterization of an O-glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer's disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:34-41.
- Clausen H, Benneth EP. One family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology* 1996;6:635-646.
- Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, et al. Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13044-13049.
- Rudd PM, Wormald MR, Wing DR, Prusiner SB and Dwek RA. Prion glycoprotein: Structure, dynamics and roles for sugars. *Biochemistry* 2001;40:3759-3766.
- Chen PY, Lin CC, Chang YT, Lin SC, Chan SI. One O-linked sugar can affect the coil-to-beta structural transition of the prion peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12633-12638.
- Quaglio E, Chiesa R, Harris A. Copper converts the Cellular prion protein into a protease-resistant species than is distinct from the scrapie isoform. *J Biol Chem* 2001;276:11432-11438.
- Kuczius T, Buschmann A, Zhang W, Karch H, Becker K, Peters G, Groschup MH. Cellular prion protein acquires resistance to proteolytic degradation following copper ion binding. *Biol Chem* 2004;385:739-747.
- Martins VR, Brentani RR. The biology of the cellular prion protein. *Neurochem International* 2002;41:353-355.
- Dormont D. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Letters* 2002;529:17-21.
- Cashman NR, Caughey B. Prion diseases, close to effective therapy?. *Nat Rev Drug Discov* 2004;10:874-884.
- Brown P. Drug therapy in human and experimental transmissible spongiform encephalopathy. *Neurology* 2002;58:1720-1725.
- Mallucci G, Collinge J. Rational targeting for prion therapeutics. *Nat Revs* 2005;6:23-34.
- Rossi G, Salmons M, Forloni G, Bugiani O, Tagliavini F. Therapeutic approaches to prion diseases. *Clin Lab Med* 2003;23:187-208.
- Ramasamy I, Law M, Collins S, Brooke F. Organ distribution of prion proteins in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Infect Dis* 2003;3:214-222.
- Hopkin M. Fears grow as blood stocks pass on prion undetected. *Nature* 2004; 430:712.
- Peden AH, Head MW, Ritchie DI, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 2004;264:527-529.
- Van Everbroeck B, Dewulf E, Pals P, Lubke U, Martin JJ, Cras P. The role of cytokines, astrocytes, microglia and apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging*. 2002;23:59-64.
- Perry VH, Cunningham C, Boche D. Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr Opin Neurol*. 2002;15:349-354.
- Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun*. 2004; 18:407-413.