

Priones y encefalopatía espongiforme bovina

INVESTIGACIÓN y CIENCIA, julio, 2001

Los tests actuales revelan si un animal sacrificado padecía la enfermedad de las vacas locas en un grado avanzado, pero distan mucho de poder asegurar que una pieza de carne adquirida en el comercio está exenta de peligro. En los nuevos tests basados en los mecanismos y en la velocidad de reproducción de los agentes causales de la encefalopatía espongiforme bovina y de otros priones infecciosos podría hallarse la solución

Manfred Eigen

Desde que apareció en Europa el primer caso de enfermedad de las vacas locas reina una gran inquietud entre la población. La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) ocupa portadas de periódicos y revistas. La patología debe su nombre a la degeneración que en forma de esponja aparece en el sistema nervioso central en las vacas que sufren el estadio final de la enfermedad.

Por lo que sabemos, la EEB puede transmitirse también a las personas y, después de un período de incubación de uno a varios años, provocar una nueva variedad de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, que termina en una demencia progresiva y en la muerte. (La genuina enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, conocida desde hace tiempo, sigue el mismo curso, pero no es contagiosa. Surge espontánea, sin intervención de factores externos, con una probabilidad sumamente escasa.)

¿Qué riesgo hay de infectarse? ¿Qué se puede comer sin peligro? ¿Hasta qué punto son seguros los tests utilizados para detectar la enfermedad? ¿Cuánto dura el período de incubación en las vacas y en las personas? Se trata de preguntas inquietantes a las que no podemos ofrecer respuestas definitivas y exactas, por una razón poderosa: nos faltan datos sobre la multiplicación del agente causal de la enfermedad de las vacas locas. Desconocemos cómo se originan los síntomas característicos. Para entender el mecanismo de infección de la EEB y sus efectos resulta indispensable poner en claro la cinética de los procesos moleculares subyacentes. Sólo así podremos encontrar medidas eficaces para paliar la epidemia.

En un artículo que publiqué en 1996 analizaba las distintas hipótesis sobre la multiplicación del agente causal de la EEB y de otros "priones" para determinar su relación con el curso clínico y los conocimientos adquiridos sobre la difusión de la epidemia. Los nuevos hallazgos confirman las conclusiones a que llegaba en dicho trabajo. Entretanto, basándose en aquellas conclusiones, se ha desarrollado un modelo molecular que ha servido de fundamento para un nuevo test de detección de agentes infecciosos; la prueba permite demostrar la presencia de priones de la EEB en unas concentraciones de diez a cien veces inferiores a las que se necesitan con los métodos estándar actuales. Se podrá así diagnosticar la enfermedad de las vacas locas en una fase precoz. En cualquier caso, seguirá necesitándose un test mucho más sensible para poder asegurar que una determinada pieza de carne de ternera se puede consumir sin peligro, es decir, para garantizar que contiene menos priones peligrosos de los requeridos para transmitir la enfermedad.

¿ Qué es un prion ?

A Stanley Prusiner., de la Universidad de California en San Francisco, le corresponde el mérito, galardonado con el Nobel de química en 1997, de haber demostrado que una proteína era el agente infeccioso de la EEB y enfermedades afines. Comprobó la presencia en todos los organismos sanos de una proteína con una secuencia de aminoácidos siempre idéntica cuya función era hasta entonces desconocida. La llamó prion. Hoy se habla de proteína priónica (PrP) y se especifica su forma celular normal con el sufijo "c" (inicial de 'célula'); en cambio, el sufijo "sc" designa la variante patológica infecciosa. Deriva el sufijo "sc" de la enfermedad epidémica mortal conocida desde hace tiempo en las ovejas con el nombre de *scrapie*; en ésta, ya principios de los años ochenta, Prusiner centró sus investigaciones, cuando todavía se desconocía la EEB. La PrPc difiere de la PrPsc sólo en su estructura espacial, esto es, en el plegamiento de la cadena de aminoácidos.

Una molécula de PrPsc sola no es infecciosa. La "unidad infecciosa", es decir, la cantidad mínima de moléculas que puede desencadenar la infección, comprende al menos 100.000 moléculas de PrPsc. Ha quedado demostrado en experimentos en los que se inyectaron diferentes cantidades de PrPsc en animales, observando luego cuántos de cada grupo del ensayo enfermaban al cabo de determinado tiempo.

Una de las demostraciones más convincentes a favor de la hipótesis de Prusiner sobre la instauración de las enfermedades por priones la aportaron Charles Weissmann y su equipo, de la Universidad de Zurich. Revelaron que en ratones a los que se les había eliminado el gen *PrP*, impidiendo en consecuencia la síntesis de la proteína PrPc, no producía ningún efecto la infección con PrPsc.

La demostración cuantitativa de que, de acuerdo con la hipótesis de Prusiner, los priones no contienen material hereditario en forma de ácidos nucleicos fue lograda por Detlev Riesner, de la Universidad de Düsseldorf. A través de mediciones fisicoquímicas extraordinariamente sensibles excluyó la presencia de ARN o de ADN en los agentes

causales de enfermedades como la EEB. Basándose en los límites de detección que presenta el método de Riesner puede excluirse que las unidades infecciosas de Prpsc tengan más de una molécula de ácido nucleico de una longitud máxima de 100 nucleótidos; esto es en todo caso insuficiente para codificar la proteína priónica.

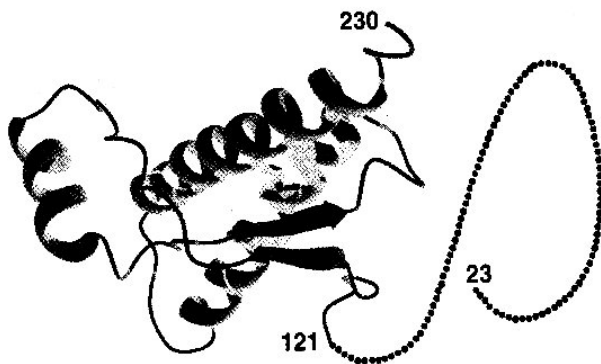
Lo anterior nos lleva a una afirmación importante: la EEB y otras enfermedades por priones son "infecciosas" en el sentido de que su agente causal se reproduce exponencialmente. Hasta ahora todas las enfermedades infecciosas se atribuían a agentes "re- producibles", en cuya base se halla la duplicación del sustrato hereditario, representado por ARN o ADN. No es el caso en los priones. Sin embargo, tal descubrimiento no echa por tierra los conocimientos de la virología y la bacteriología. Lo único que demuestra es que hay sistemas constituidos exclusivamente por proteínas que "simulan" el comportamiento de replicación típico de los ácidos nucleicos.

A Kurt Wüthrich, del Instituto Politécnico Federal de Zurich, le debemos otro avance en la investigación. Mediante el recurso a la resonancia: magnética nuclear (RMN) él y su grupo determinaron la estructura de los priones normales. Estos tendrían un dominio "globular", donde las cadenas de aminoácidos presentan tres estructuras en tirabuzón (helicoidales) unidas. El dominio, como el resto de la molécula, puede ser "digerido" por una proteasa, lo que no es posible para el segmento análogo de la Prpsc. La razón de tal diferencia reside, con probabilidad, en que la variedad patológica presenta menos hélices y más "hojas beta"; en éstas la cadena de aminoácidos conforma un entrelazado parecido a una lámina ondulada. Aquí las enzimas sólo pueden disociar la extremidad abierta de la cadena.

En semejante comportamiento dispar de los Prpc y de los Prpsc se fundan los tests hoy utilizados para la detección de la EEB. Kurt Wüthrich ha examinado las diferencias estructurales del dominio globular en priones de diversas especies y encontrado ahí la clave para explicar la posible transmisión de la enfermedad. Se ha observado, por ejemplo, que las proteínas priónicas de la vaca y del hombre presentan estructuras muy similares, indicio de una discreta probabilidad de que la epidemia pase de una especie a la otra.

Stanley Prusiner propuso también un mecanismo ..., para la transformación de la PrPC en PrPSC. A tenor del mismo, una molécula de Prpsc se enlazaría con otra de PrPC y le haría adoptar la forma patológica. Dicho mecanismo correspondería a la autocatálisis directa de una transformación estructural. El agente patógeno actuaría favoreciendo la conversión de la forma inocua en la maligna, procurándose de ese modo su propia reproducción.

Peter Lansbury, del Brigham and Women's Hospital de Boston, propone, por el contrario, un mecanismo de amplificación de las cadenas en torno a un "germen" de crecimiento. Según Lansbury, la multiplicación de la Prpsc patológica se asemejaría a un proceso de polimerización, similar a la producción de sustancias sintéticas lineales como el polietileno:



1. ESTRUCTURA DE LA PROTEINA PRIONICA NORMAL. La proteína priónica normal de la vaca (PrPC) está "plegada" de forma complicada entre los aminoácidos números 121 y 230 mientras que el resto de la molécula (aminoácidos números 23 a 121) forman una cadena libremente fluctuante. La zona plegada contiene tres hélices a enrolladas en forma de sacacorchos (*en verde*) y una pequeña hoja plegable ~ (*en azul*). Al transformarse en la forma patógena Prpsc esta parte de la molécula adopta una estructura espacial diferente.

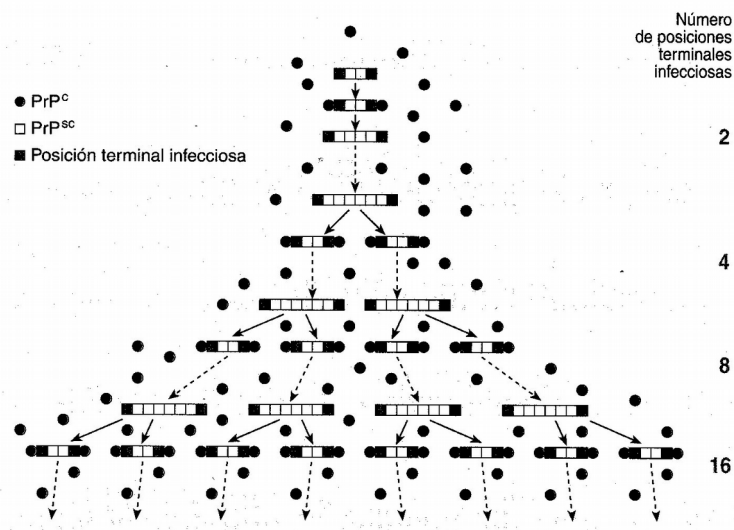
una cadena de unidades de Prpsc en fila crece con la incorporación, una tras otra, de moléculas de Prpc que van transformándose en la variante patológica. Presuponer la constitución de un germen para el crecimiento de la cadena significa que deba alcanzar una longitud crítica antes de que la incorporación de nuevas unidades se desarrolle a mayor velocidad que la pérdida de las viejas por separación. Con este modelo Lansbury pretende encontrar explicación a dos hechos: que las Prpsc adopten en el cerebro de las víctimas la forma de bastoncitos y que la "unidad infecciosa" comprenda un elevado número de moléculas PrP .

¿Cómo actúa un prion?

En mi trabajo de 1996 me proponía evaluar los dos mecanismos desde el punto de vista de la cinética química. Se comprobó que, si se asumen para las constantes de velocidad y equilibrio valores análogos a los conocidos para las interacciones entre proteínas, el mecanismo de \sim rusiner con sólo dos unidades priónicas no puede funcionar en la fase catalítica. Aplicado a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob humana, espontánea, esto significa unas condiciones tan críticas que, dados unos determinados parámetros, la concentración de PrP^{Sc} debería ir en aumento constante o en continuo descenso. Valdría en este caso el principio del "todo o nada": la enfermedad debería extinguirse constantemente por sí misma antes de irrumpir, o bien aparecer espontánea con una probabilidad mucho mayor que lo que realmente sucede.

El problema se resuelve cuando se introduce una interacción cooperativa entre más de dos unidades de proteínas. Así dirigen su actividad ciertas enzimas "alostéricas", que sólo adoptan una forma activa mediante la asociación con una molécula efectora. A través de la cooperación, y contando con parámetros cinéticos apropiados, la transformación estructural autocatalítica consiente alcanzar un valor umbral de irrupción de la enfermedad.

El mecanismo de Lansbury sobre formación del germen incluye también una suerte de interacción cooperativa que, en su caso, actúa entre los componentes de la cadena PrP^{Sc}. Un solo componente no puede



2. LA MULTIPLICACION de los priones infecciosos se desarrolla en dos fases. En la primera, las cadenas de PrP^{sc} fijan en sus extremos moléculas de PrP^c propias del organismo y las transforman en variantes patógenas. En una segunda fase, las cadenas en crecimiento se fragmentan; su longitud permanece así constante en el tiempo. Mientras que el crecimiento de la cadena no hace aumentar el número de unidades de PrP^{sc} infecciosas, la rotura de las cadenas es responsable de su crecimiento exponencial. En este esquema el proceso se representa de forma mucho más regular de lo que ocurre en la realidad.

retener y transformar una molécula PrP^c. Para que la transformación se produzca de un modo eficaz deben actuar como mínimo tantos componentes cuantos contiene el núcleo germinal. Sólo entonces la velocidad de crecimiento de la cadena superará la de su destrucción.

Persiste una dificultad. Una vez alcanzado el tamaño de germen, la cadena sigue creciendo de un modo autocatalítico, aunque sin la aceleración exponencial que caracteriza a las reacciones autocatalíticas. Una aceleración exponencial presupone que, después de la transformación, ya sea el catalizador originario o sea el producto de su reacción permanezcan disponibles para ulteriores ciclos autocatalíticos, de suerte que el número de las especies catalíticamente activas se doble en cada tanda de reacciones. Sin embargo, no es eso lo que sucede en una polimerización creciente: en cada paso sólo permanece catalíticamente activa la unidad proteica del extremo de la cadena.

También hay solución para esta dificultad. El mecanismo de polimerización fomenta un crecimiento exponencial siempre que se dé una condición: que las cadenas en elongación se fragmenten de continuo, liberando nuevos catalizadores. Martin Nowak (un compañero de los tiempos en que se investigaban los procesos de evolución molecular en Gotingen y Viena, contratado hoy por el Instituto de Estudios Avanzados de Princeton) captó la idea de la rotura de la cadena y construyó un delicado modelo. En los últimos años, gracias a la traducción del modelo en una expresión matemática, Joanna Masel, de la Universidad de Oxford, ha aclarado muchos pormenores del curso de las enfermedades por priones que se resistían a la explicación.

Así se multiplica el agente causal de la EEB

En su modelo, Nowak introdujo ecuaciones que expresan el estado de equilibrio para el crecimiento, la rotura y la disolución de cadenas proteicas de cualquier longitud. En esencia el crecimiento es expresión de la elongación de las cadenas. La elongación y la rotura de la cadena cooperan para que el número de fragmentos terminales de las cadenas catalíticamente activos aumente de forma exponencial. La desintegración, a la que están sometidos todos los polímeros, hace que los núcleos terminales infecciosos tengan una vida limitada.

La velocidad de elongación resulta de tres factores que describen procesos parcialmente en competición:

- la unión de una unidad proteica PrPC a uno de los dos extremos (o ambos) de la cadena de PrPsc; su velocidad está limitada por la frecuencia de encuentros entre las dos moléculas, función a su vez del movimiento de difusión;
- la separación de la unidad PrPC antes de que su estructura se transforme;
- la transformación estructural de la PrPC en PrPsc, cambio del cual depende la integración estable en la cadena; establece la tasa de elongación.

Las velocidades de estos tres procesos, siguiendo el modelo de la cinética enzimática, pueden describirse mediante una expresión matemática. En lugar de construir una ecuación de equilibrio para cada una de las cadenas PrPsc, Nowak utiliza dos términos sumatorios que introdujo yo en 1996. Uno incluye las unidades PrP contenidas en las cadenas de polímeros de diversa longitud. El otro es una medida del número de dichas cadenas y, en consecuencia, de todas las posiciones terminales catalíticamente activas.

Esta presentación conjunta tiene la ventaja de compensar muchas expresiones propias de las ecuaciones individuales. Al final quedan sólo dos ecuaciones diferenciales lineales, con resolución analítica, que describen la variación de los dos términos en el curso del tiempo. Las soluciones son el resultado de la suma de dos funciones exponenciales en las que el tiempo figura como exponente una vez con signo positivo y otra con signo negativo.

Una función representa un término de crecimiento; la otra, un término de disminución. Este último describe la situación de equilibrio dinámico en el que se mantiene estacionaria una determinada distribución de longitudes de la cadena con un valor medio establecido. Al cabo de un tiempo, su contribución se torna despreciable y sólo queda activa la porción terminal. Luego crece exponencialmente tanto el número de cadenas poliméricas como el de unidades PrPSC contenidas en ellas, hasta superar la cuota de priones normales.

Período de incubación ~

Joanna Masel ha desarrollado este modelo, analizando todas sus consecuencias y comparándolas con los datos experimentales. Sus resultados revisten máximo interés para un diagnóstico precoz de las enfermedades por priones. Parece claro que la incorporación de una molécula de PrPc en una cadena de PrPSC y su transformación en una proteína patológica requiere cerca de un cuarto de segundo. La cadena estable de PrPSC tiene una longitud media de unas mil unidades. En consecuencia, para su formación necesita mil veces más tiempo. Los experimentos indican un período comprendido entre cinco y veinte días. Para que pueda instaurarse un equilibrio transitorio, con una longitud de cadena estable, en este intervalo de tiempo ha de tener lugar por término medio una rotura de la cadena. El tiempo medio para que se presente una rotura en un determinado punto se cifra en torno a los treinta años. Puesto que cada cadena contiene por término medio unos mil posibles puntos de rotura, en el conjunto del agregado se registra una rotura de la cadena aproximadamente cada diez días. La construcción de la cadena y su rotura se encuentran, pues, en el fiel de la balanza. Pero el número de cadenas (y con ello el de sus extremos activos) crece de un modo exponencial.

Otra magnitud importante es la relación entre la velocidad de construcción y la velocidad de destrucción de las cadenas PrPsc. Según mediciones realizadas en animales de laboratorio ambas velocidades serían de un orden semejante. Esto significa que el material infeccioso, para sobrevivir como tal, debe hallarse en continua replicación. No se conocen las causas de la destrucción; algo tendrán que ver las defensas inmunitarias, aunque pudieran haber otros procesos que desmontaran o inactivaran las cadenas PrPsc. Por eso la velocidad de destrucción se expresa con un término negativo no específico, proporcional a la cantidad de material infeccioso presente. El peso que pueda tener esto para el cálculo de los tiempos de reacción es prácticamente despreciable.

Conviene traer a primer plano un punto más. El sustrato de la reacción, el PrPc en transformación, se mueve libremente en la solución y puede así entrar en contacto con una cadena de PrPsc de longitud creciente (lo cual justifica la imagen de reacciones rápidas de "difusión controlada"). Por el contrario, las cadenas PrPsc acostumbran hallarse unidas a membranas. Esto explica por qué la "unidad infecciosa" comprende alrededor de 100.000 moléculas de priones a pesar de que las cadenas, por término medio, se rompen ya con una longitud de unas mil. Los fragmentos rotos permanecen vecinos y cooperan entre sí, como en un enjambre. Sólo cuando se desprenden de la membrana pueden dispersarse a distancia.

De los trabajos de Masel se infiere que el material requiere semanas para redoblar. En amasar una concentración perceptible por los útiles analíticos se tarda casi un año.

Quedan muchas cuestiones abiertas. No podemos dar cuenta todavía de las fases inicial y final de la infección, las vías de contagio, el tiempo empleado en dañar el cerebro y la médula espinal o los trastornos operados en la fase final de la enfermedad. En todo caso la respuesta a estas preguntas corresponde a los especialistas en anatomía patológica del sistema nervioso.