

Trabajo Fin de Grado

Cepas priónicas en mamíferos

Prion strains in mammals

Autora

Esther Buil Reiné

Tutora

Eva Monleón Moscardó

Cotutora

M^a Carmen Garza Garces

Facultad de Medicina

Año 2018

Índice de contenidos

Listado de abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
1. <u>El prión y las enfermedades priónicas</u>	4
1.1 Hipótesis prión.....	5
1.2 Gen <i>PRNP</i>	5
1.3 Las enfermedades priónicas en mamíferos.....	6
2. <u>Las cepas priónicas</u>	9
2.1 Métodos de identificación de cepas.....	12
2.2 Factores implicados en la variación o diversidad de las cepas.....	15
2.3 Características de las cepas priónicas.....	18
3. <u>Cepas priónicas sintéticas</u>	23
4. <u>Cepas vs tipos priónicos</u>	27
5. <u>Conclusión</u>	28
Referencias bibliográficas.....	30

Listado de abreviaturas

- (DY) Adormilado
- (EEB) Encefalopatía espongiforme bovina
- (EET) Encefalopatías Espongiformes Transmisibles
- (ECJ) Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
- (ETV) Encefalopatía transmisible del visón
- (fECJ) Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar
- (GSS) Enfermedad de Gerstmann Sträussler-Scheinker
- (HY) Hiperactivo
- (IFF) Insomnio familiar fatal
- (kDa) Kilodalton
- (Met) Metionina
- (PCR) Reacción en cadena de la polimerasa
- (PE) Fosfatidiletanolamina
- (p.i.) Periodo de incubación
- (pK) Proteinasa K
- (PMCA) Amplificación cíclica de proteínas con plegamientos anormales
- (PrP^C) Proteína priónica celular
- (PrP^{Sc}) Proteína priónica Scrapie
- (recPrP) PrP recombinante altamente purificada
- (eECJ) Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica
- (SNC) Sistema nervioso central
- (Val) Valina
- (vECJ) Creutzfeld-Jakob

Resumen

Los priones son partículas infecciosas protéicas (PrP^{Sc}) cuya estructura primaria es idéntica a la proteína prion celular pero con plegamientos aberrantes. Causan enfermedades neurodegenerativas fatales en humanos y numerosas especies animales que se denominan Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET). No se ha descrito la presencia de material genético asociado a la PrP^{Sc}, considerado hasta el momento el agente causal, sin embargo se han identificado un gran número de cepas prionicas con características específicas (periodo de incubación, perfil bioquímico de PrP^{Sc}, patrón neuropatológico...) que se mantienen invariables tras varios pases del inóculo en huéspedes genéticamente idénticos, lo que permite su distinción. Los parámetros que regulan la variabilidad de las cepas continúan siendo objetivo de estudio en la actualidad. Es conocido que intervienen factores dependientes del propio agente infeccioso, principalmente la estructura conformacional de la PrP^{Sc} y dependientes del huésped, principalmente el gen *PRNP* que codifica la proteína prion. Igualmente, el mecanismo a partir del cual la PrP^{Sc} adquiere su conformación infecciosa todavía no está establecido, recientes estudios sugieren que moléculas del huésped como ARN y fosfatidiletanolamina podrían actuar como cofactores replicativos. Los objetivos de esta revisión bibliográfica son recopilar los principales avances científicos relacionados con las cepas priónicas a lo largo de la historia, principalmente los que se centran en su caracterización y en descifrar los componentes moleculares que determinan la infecciosidad de esta proteína y su mecanismo replicativo.

Palabras clave: Prions, prion strains, protein misfolding, Scrapie, transmissible spongiform encephalopathies (TSEs)

Abastract

Prions are proteinic infectious particles (PrP^{Sc}) whose primary structure is identical to the cellular prion protein but with aberrant folds. They cause fatal neurodegenerative diseases in humans and numerous animal species that are called Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE). The presence of genetic material associated with PrP^{Sc} has not been described, until the moment of the causal agent; however a large number of prion strains with specific characteristics have been identified (incubation period, biochemical profile of PrP^{Sc}, neuropathological pattern...) that remains unchanged after several passes of the inoculum in the identical genetic hosts, which allows its distinction. The parameters that regulate the variability of the strains continue being the objective of study at present. It is known that the factors dependent on the host (*PRNP* gene encoding the prion protein) and those dependent on the infectious agent itself (the tertiary structure of PrP^{Sc}) are involved. Likewise, the mechanism starting from PrP^{Sc} acquires its infectious conformation, it is not yet established, recent studies that molecules of the RNA and phosphatidylethanolamine type could act as replicative cofactors. The objectives of this bibliographic review are the main scientific advances related to the prion strains throughout history, mainly those that focus on their characterization and on deciphering the molecular components that determine the infectivity of this protein and its replicative mechanism.

Keywords: Prions, prion strains, protein misfolding, Scrapie, transmissible spongiform encephalopathies (TSEs)

1. EL PRIÓN Y LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

El prión se define como una proteína cuya secuencia aminoacídica es idéntica a la proteína prión celular, codificada por el hospedador (PrP^{C}), pero que presenta una conformación tridimensional anormal que la transforma en un agente infeccioso (PrP^{Sc})[1].

Las enfermedades priónicas o Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), se definen como desordenes neurodegenerativos letales cuyo órgano diana es el sistema nervioso central (SNC) de humanos y diferentes especies animales [2]. Las EETs se caracterizan por presentar un periodo de incubación muy prolongado y una amplia variabilidad en sus presentaciones clínicas y patrón neuropatológico [3]. Actualmente no existe cura para estas enfermedades y la evolución es siempre fatal.

La isoforma patológica del prión se acumula en el tejido nervioso del individuo infectado y desencadena un proceso neurodegenerativo en su organismo. En humanos, las principales manifestaciones clínicas de este proceso pueden clasificarse en tres grandes grupos: deterioro cognitivo, alteraciones motoras y síntomas psiquiátricos. La forma de presentación más frecuente se caracteriza por una demencia progresiva rápida con clínica visual o afectación cerebelar y mutismo acinético[4]. El hallazgo anatomopatológico más característico de las EETs es la espongiosis o vacuolización cerebral que afecta tanto al pericarion como al neuropilo (Fig. 1). La pérdida neuronal es característica y la presencia de placas amiloides formadas por PrP^{Sc} completa el cuadro histopatológico[5].

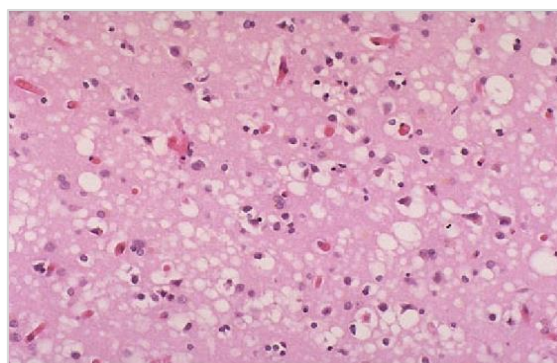


Fig. 1. EET, Espongiosis en el neuropilo e intraneuronal. Hematoxilina y Eosina[6].

1.1 Hipótesis del prión

La naturaleza exacta del agente causal de las EETs aún no se ha aclarado pero la hipótesis del prión es la más generalmente aceptada. Su principal postulado es que el prión es sólo una proteína y fue propuesto por Prusiner en 1982[7]. Este concepto fue planteado inicialmente por Griffith en 1967. La hipótesis del prión propone que las enfermedades priónicas están causadas por la acumulación de una proteína celular normal (PrP^{C}) modificada postraduccionalmente. Esta proteína patológica denominada PrP^{Sc} es el resultado de un cambio conformacional de la PrP^{C} que le confiere propiedades distintas a la celular[8].

La principal diferencia estructural reside en que la PrP^{C} tiene un 40% de hélice alfa y apenas un 3% de hoja plegada beta. Sin embargo, la PrP^{Sc} presenta una estructura secundaria con predominio de láminas beta. Este cambio conformacional también supone cambios en las propiedades de la proteína como su solubilidad en detergentes o la resistencia frente a proteasas. La PrP^{C} es soluble en detergentes suaves no desnaturalizantes y es digerida fácilmente por proteasas mientras que la PrP^{Sc} es insoluble y sólo es parcialmente digerida por las proteasas produciendo el fragmento resistente conocido como PrP^{Sc} 27-30[9].

La hipótesis del prion termina con el pensamiento hasta entonces admitido de que todo agente responsable de enfermedad transmisible necesita material genético para que la enfermedad prevalezca en el huésped. También contradice el dogma de la biología de que una secuencia de aminoácidos concreta da lugar a una única estructura terciaria determinada[2]. La aceptación de la hipótesis del prión supone la existencia de dos plegamientos distintos para una única secuencia de aminoácidos. Igualmente llamativo, es que el cambio en el plegamiento de la PrP^{C} pueda ser inducido por la isoforma PrP patológica, en el caso de las encefalopatías espongiformes adquiridas, debido a que sugiere un flujo de información de una proteína a otra a nivel de la estructura terciaria[3].

1.2 Gen PRNP

La PrP^{C} , proteína que consta de 253 aminoácidos en humanos, está codificada por el gen *PRNP* que se encuentra localizado en el brazo corto (p) del cromosoma 20. (20p13). Se expresa de forma constitutiva en tejido nervioso, más concretamente en la

sinapsis. También en muchos otros tejidos, como el músculo o el tejido linfoide, si bien los niveles son mucho más bajos[8].

Su secuencia genética está muy bien conservada ya que se ha identificado en más de 15 especies de mamíferos, con una homología del 90%. Estos datos sugieren que la proteína existía antes de la especialización de los mamíferos. Los polimorfismos en este gen pueden aumentar la susceptibilidad de los mamíferos a padecer enfermedades priónicas o bien a modificar la expresión fenotípica de las mismas[4].

1.3 Las enfermedades priónicas en mamíferos

Las EETs que afectan a humanos y animales tienen origen variado ya que pueden ser hereditarias, infecciosas o esporádicas, siendo este último origen el más frecuente en el caso de las EETs humanas[2](Tabla 1).

Las EETs **hereditarias** se producen por una mutación en el gen *PRNP*, que codifica una proteína anómala. Es la acumulación de esta proteína en el sistema nervioso la que desencadena el proceso neurodegenerativo en los mamíferos infectados. En humanos, estas enfermedades son: enfermedad Creutzfeldt Jakob familiar (ECJf), la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) y el Insomnio Fatal Familiar (IFF)[10].

Las EETs **infecciosas** se producen por consumo de alimento infectado con PrP^{Sc} o bien por causa yatrogénica como tratamiento con hormonas de crecimiento, trasplante de médula o bien en intervenciones quirúrgicas con una mala esterilización del material. La primera descripción de la EETs en humanos, se denominó Kuru y apareció en individuos nativos de la tribu Fore en Papúa Nueva Guinea a consecuencia de su práctica ritualista de canibalismo (consumo de cerebros humanos infectados)[2]. A diferencia de las EETs humanas, la mayoría de las EETs animales tienen un origen infeccioso, las principales son el Scrapie, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la encefalopatía Transmisible del visón (ETV)[11].

El Scrapie o tembladera es una enfermedad conocida desde inicios del siglo XVIII entre los poseedores de rebaños de ganado ovino y caprino. La patogénesis de la enfermedad consta de una primera fase de replicación priónica en los órganos linfoides y una segunda fase de neuroinvasión. Las manifestaciones clínicas se presentan en etapas muy avanzadas de la enfermedad, lo que complica las tareas de

control epidemiológico. Algunas de ellas son ataxia, prurito y postración, terminando finalmente con la muerte del animal [12].

En 1987 se describió una nueva enfermedad priónica en el ganado bovino denominada EEB conocida comúnmente como “enfermedad de las vacas locas”, que dió lugar a una epidemia en Reino Unido y que finalmente afectó a cientos de miles de animales en toda Europa [12]. Existen evidencias suficientes para afirmar que la transmisión del prión al ganado bovino se produjo por el consumo de piensos elaborados con proteína de origen animal, en concreto de ovejas infectadas de Scrapie [11]. El Scrapie no es una enfermedad transmisible a los humanos debido a que existe un fuerte fenómeno de barrera de la especie. Sin embargo, si que se produjo un salto de barrera de la especie entre ovejas y vacas, las cuales desarrollaron EEB, cuyas manifestaciones clínicas son similares a la del Scrapie ovino [12]. Por el contrario, la EEB si se transmitió a los humanos y causó la variante de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob (vECJ). En 1996 se detectó un caso de ECJ cuyas manifestaciones clínicas no coincidían del todo con las tres formas conocidas hasta aquel momento. Diversas investigaciones a nivel clínico, epidemiológico y molecular permitieron llegar a la conclusión de que el agente infeccioso encontrado en estos pacientes era el mismo que el de las vacas infectadas con EEB. El número de casos de vECJ entre la población fue y continua siendo muy limitado, lo que indica una fuerte barrera de especie[13].

La ETV es menos frecuente. El primer caso fue descrito en 1960 en Estados Unidos. No existen evidencias, pero se cree que la transmisión de la enfermedad se produjo por vía oral, al ingerir los visones restos de carne bovina contaminada. Los casos descritos son esporádicos y tienen lugar en zonas como Canadá y Finlandia, donde es común la explotación de estos animales [12].

La mayoría de casos descritos de EET en humanos son de origen indeterminado, y constituyen el grupo de las EET **esporádicas**. La forma esporádica o idiopática de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (eECJ) comprende casi el 85-90% de las enfermedades priónicas en humanos, con una incidencia mundial de 1 o 2 nuevos casos por millón de habitantes por año y una distribución geográfica amplia[8]. Suele presentarse alrededor de los 60 años de edad bajo la forma clásica de un cuadro demencial rápidamente progresivo asociado a mioclonos y electroencefalograma periódico[14]. Histológicamente existe afectación difusa de la sustancia gris superficial y profunda del SNC, con degeneración espongiiforme, astrogliosis y pérdida

neuronal[3]. La supervivencia suele ser de un año y no existe un tratamiento realmente efectivo[14].

Tabla 1 .Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en humanos y animales.

EETs HUMANAS	Patogenia
ECJ esporádica (eECJ)	Idiopática
ECJ familiar (fECJ)	Hereditaria
ECJ iatrogénica (iECJ)	Infección por contaminación de priones (hormona de crecimiento...)
ECJ variante (vECJ)	Infección por priones bovinos
Insomnio familiar fatal (IFF)	Hereditaria
Enfermedad de Gerstmann Sträussler-Scheinker (GSS)	Hereditaria
Kuru	Infección. Canibalismo ritualista.
EETs ANIMALES	
Scrapie	Infección
EEB	Infección
ETV	Desconocida
Enfermedad caquetizante crónica de los ciervos	Infección
Encefalopatía Espongiforme Felina	Infección

2. LAS CEPAS PRIÓNICAS

El término “cepa” deriva de la terminología utilizada en virología ya que inicialmente se creía que las EETs estaban causadas por virus [2]. En 1938 Cuillé y Chelle fueron capaces de transmitir el Scrapie de una oveja a otra por inoculación intraocular a partir de material proveniente de la médula espinal del animal infectado. La conclusión extraída por los investigadores a raíz de este éxito experimental fue que el agente infeccioso causante del Scrapie era un virus. En experimentos posteriores, se detectó que las propiedades del Scrapie cambiaban tras transmisiones seriadas en distintos roedores. Es decir, propiedades como el p.i. o el patrón de lesión neurológico no permanecían constantes [2]. En el momento en el que fueron llevadas a cabo estas investigaciones (años 60 y 70), era bien conocido que una cepa vírica era el resultado de una combinación entre el genoma vírico, el genoma del huésped y de la relación entre ambos [2]. Por tanto, esta variabilidad detectada en las distintas transmisiones en roedores fueron interpretadas por los investigadores como distintas cepas Scrapie. En consecuencia, la hipótesis que consideraba al agente productor de las EETs como un virus cobró más fuerza [2].

La primera evidencia de la existencia de cepas priónicas no se observó en roedores sino en pequeños rumiantes. En 1961, Pattinson y Millson inocularon cabras con un homogenizado de tejido nervioso procedente de ovejas afectadas por la enfermedad de Scrapie y observaron que los animales inoculados desarrollaban dos síndromes clínicos distintos que fueron denominados “**nervous**”, (después se le denominó “drowsy”, “dormido”) y “**scratching**” (rascado), debido al picor presentado por los animales, notorio por sus intentos de rascado[13] (Fig 2). Estos autores sugirieron que unas cepas del agente causal del Scrapie producían el fenotipo “nervioso” y otras cepas el fenotipo “rascado”, haciendo referencia por primera vez al término “cepa”.

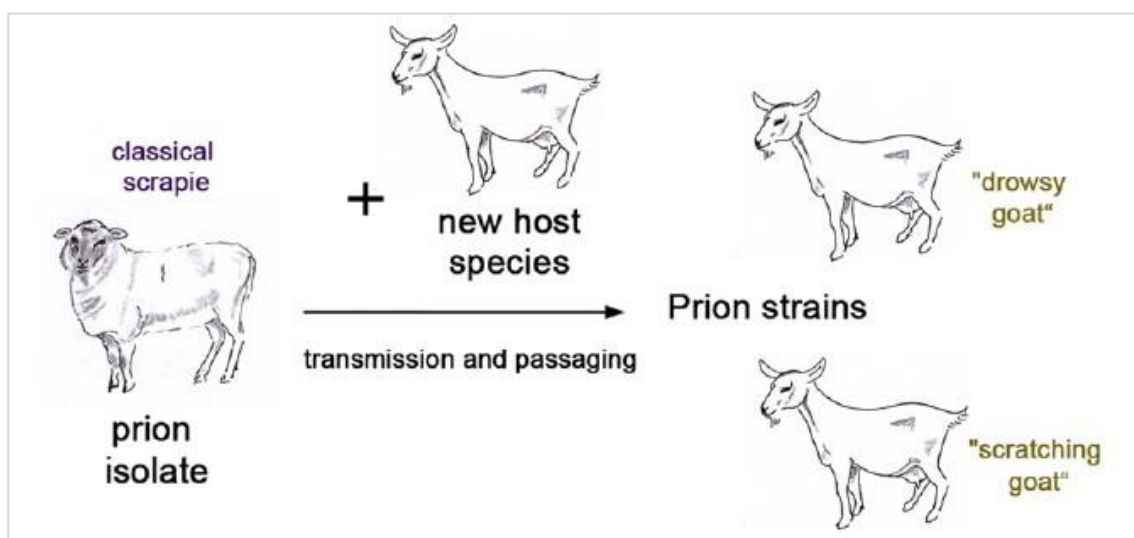
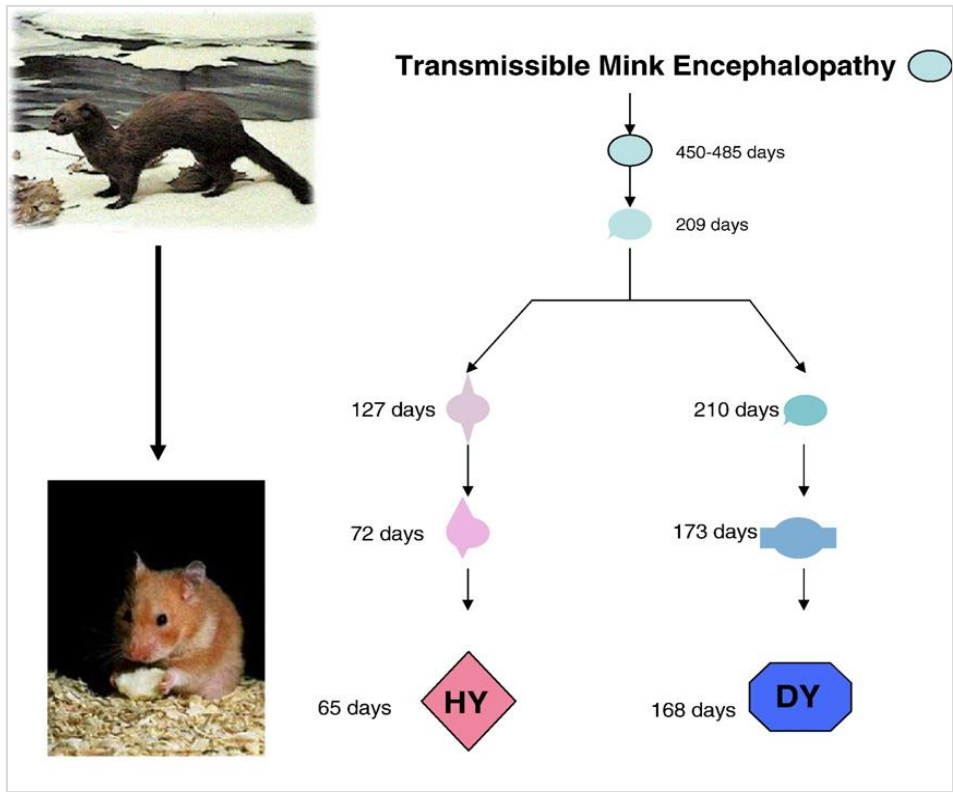


Fig. 2. Esquema representativo de las primeras cepas priónicas que fueron aisladas en cabras tras haber sido inoculadas con el agente causal del Scrapie en ovejas[2].

Posteriormente, en la década de los 60 se consiguió transmitir el agente causal del Scrapie a ratones, observando que tras varios pases se producía una adaptación del agente al ratón, reduciéndose el p.i. y evidenciando la existencia de la barrera de la especie [2]. En 1968 Fraser y Dickinson observaron que cuando se infectaban experimentalmente diferentes líneas de ratones con un mismo inóculo, el periodo de incubación, el cuadro clínico y la distribución de las lesiones en el SNC dependía de la línea de ratón utilizada, es decir, del genotipo del hospedador. Por lo tanto, se evidenció que **se podía utilizar hospedadores bien definidos genéticamente para detectar diferencias entre agentes causales del Scrapie o “cepas”**[13]. De esta forma las cepas priónicas fueron primeramente caracterizadas utilizando únicamente las características patogénicas como periodo de incubación, signos clínicos y perfil lesional [1].

Los estudios realizados con priones en el modelo murino fueron los primeros en indicar que las diferentes cepas priónicas también presentaban diferentes propiedades bioquímicas [1]. El primer estudio se realizó utilizando dos cepas bien caracterizadas biológicamente aisladas de hamsters inoculados con el agente causal de ETV (Fig 3). En el primer pase los animales de experimentación presentaron inicialmente un largo p.i. que, tras sucesivos pases disminuyó y quedó estabilizado en 2 grupos de animales con diferentes signos clínicos: 1) un grupo con un p.i. de 150 días que presentaba principalmente aletargamiento; 2) otro grupo con un p.i. más corto, de 60 días, que presentaba hiperactividad. Estas dos cepas se denominaron, en función de los síndromes clínicos observados, hiper (**HY**; hiperactivo) y drowsy (**DY**; adormilado)[16].

Estudios realizados con la PrP^{Sc} purificada a partir de encéfalos de animales infectados con estas cepas demostraron diferencias en la relativa solubilidad en detergentes, la resistencia la proteinasa K (pK) y la movilidad electroforética tras el tratamiento con la pK [17]. Las diferencias en la movilidad electroforética de la fracción resistente a proteasas de la PrP^{Sc} se debe a las diferencias en la exposición de los sitios de escisión, que a su vez está determinado por la estructura conformacional de la PrP^{Sc}[4]. Esta evidencia sugería que las diferencias entre las cepas priónicas se debían a la distinta conformación de las moléculas de PrP^{Sc}.



Signos clínicos	Hiper-excitabilidad	Letargo
Perfil deposicional de PrP ^{Sc}	Mayoritariamente depósitos difusos	Placas amiloides
Movilidad electroforética de PrP ^{Sc}	Banda no glicosilada 21 kDa	Banda no glicosilada 19 kDa
Resistencia a pK de PrP ^{Sc}	Altamente resistente	Ligeramente resistente
Infectividad periférica	Si	No
Infeccioso para el visón (Memoria)	No	Si

Fig. 3. Origen y propiedades de las cepas HY y DY en hamsters[13]. A partir de la sucesión de pases de la ETV en hamsters, el p.i.de la enfermedad se va reduciendo de forma progresiva. Finalmente, tras numerosos pases se produce la estabilización, dando lugar a las dos cepas previamente mencionadas,

HY y **DY**. Estas dos cepas presentan distintas propiedades clínicas, neuropatológicas, infecciosas y bioquímicas.

Estudios posteriores utilizando, además de las técnicas descritas, técnicas de espectroscopia, inmunoensayos con diferentes anticuerpos y microscopia electrónica, confirman la hipótesis de que las diferencias entre las cepas priónicas se deben a las distintas conformaciones de la PrP^{Sc} , aunque todavía son necesarios estudios más concluyentes [16].

2.1 Métodos de identificación de cepas

Los principales métodos que se utilizan actualmente para identificar y caracterizar las cepas priónicas se basan en las características patológicas que generan en modelos experimentales (líneas de roedores) tras varios pases y en las propiedades bioquímicas de la PrP^{Sc} [13](Fig. 4). Las características patológicas sólo se pueden determinar con fiabilidad en el ámbito experimental ya que permite controlar los parámetros del agente y del hospedador que influyen en el fenotipo de la enfermedad [16].

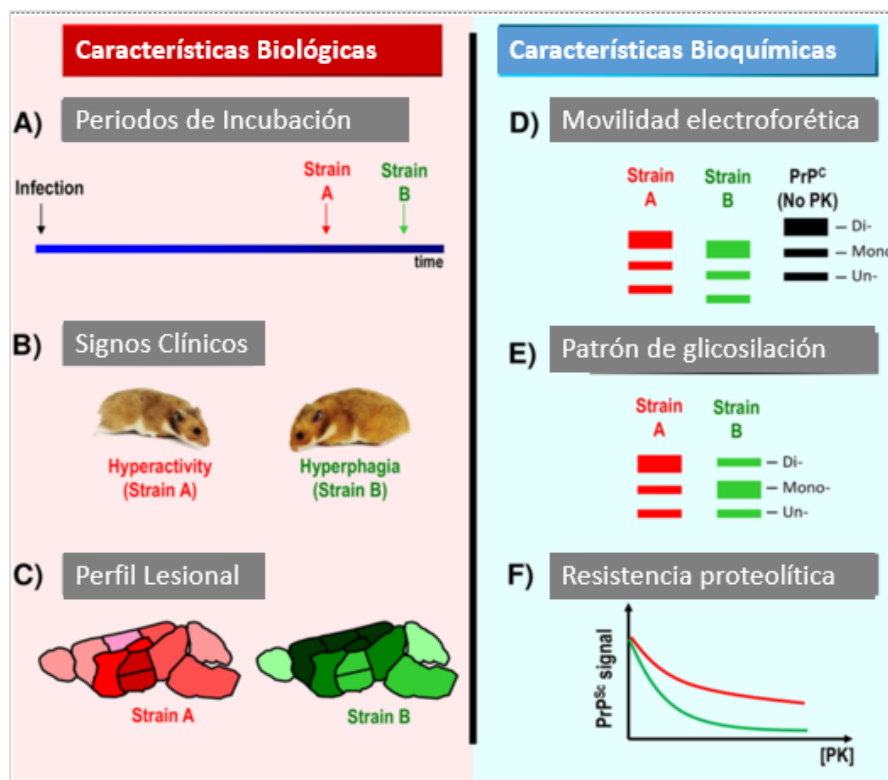


Fig.4. Características biológicas o patológicas y características bioquímicas usadas para la diferenciación de las cepas priónicas[13].

Características patológicas

Las características patológicas se determinan tras la inoculación de un homogenizado de tejido nervioso procedente de un individuo afectado de una EET en animales de experimentación, principalmente en líneas de roedores, y su posterior estabilización tras inoculaciones sucesivas o pases. Una vez estabilizada, la cepa priónica puede propagarse *in vivo* y las características de la enfermedad se mantienen [16].

Los parámetros más usados para determinar la identidad del agente priónico son:

- El **periodo de incubación** de la enfermedad: periodo de tiempo que transcurre entre la inoculación y la aparición de manifestaciones clínicas. El p.i. depende en gran medida de la ruta de inoculación[2].
- El **cuadro clínico**. Esta característica puede ser muy útil para discriminar entre cepas priónicas en algunas especies, como las cabras y los hamsters, pero es poco eficiente en otras como el ratón.
- El **perfil lesional o neuropatológico**. Cada cepa priónica da lugar a un patrón específico de degeneración espongiiforme en el SNC del animal. Asimismo, la distribución de los depósitos de PrP^{Sc} en el SNC también depende de la cepa priónica[8].

Aunque el estudio de estos parámetros es una técnica sólida y reproducible que se ha utilizado durante más de 40 años hay que tener en cuenta que no todos los fenotipos son únicos para una determinada cepa. Así, por ejemplo, 2 cepas que presentan perfiles lesionales diferentes, pueden tener un mismo p.i. y/o cuadro clínico[18].

Características bioquímicas

Las características bioquímicas de la proteína PrP^{Sc} se determinan en el tejido nervioso del individuo afectado de una EET. Actualmente existen bastantes técnicas para determinar características bioquímicas que permitan diferenciar una cepa priónica de otra. De entre todas destacan tres, por ser las más comúnmente utilizadas.

- La **movilidad electroforética que presenta el núcleo resistente de la proteína PrP^{Sc} tras la digestión por la pK** es el método más usado porque es fácil de visualizar; además, proporciona indirectamente evidencia sobre la existencia de cambios conformacionales. La resistencia parcial de los priones a esta digestión por

parte de la pK reside en la región C-terminal[1]. Parece que el plegamiento específico de cada cepa protege en diferentes puntos el lugar de escisión de la pK, dando lugar a cadenas de polipéptidos de diferente longitud y por lo tanto de diferente movilidad electroforética. De esta forma la longitud de segmento pK resistente varía en cada cepa priónica y puede ser fácilmente distinguido utilizando la técnica de Western-Blot. Sin embargo, es necesario remarcar que algunas cepas priónicas distintas resultan tener la misma movilidad electroforética [10].

- El **patrón de glicosilación** característico de cada cepa. La proteína prión tiene dos sitios de glicosilación, localizados en los aminoácidos Asn 181 y Asn 197. Estos residuos son susceptibles de glicosilarse mediante la adición de azúcares (N-glicanos), coexistiendo de manera natural 3 formas de glicosilación: la forma diglicosilada, la monoglicosilada y la no glicosilada. Las proporciones relativas de estas 3 formas de PrP^{Sc}, detectables mediante Western Blot, son diferentes en cada cepa priónica y pueden ser usadas como indicadores para la identificación de las cepas priónicas[4].

- El **grado de resistencia a la degradación proteolítica o desnaturalización**. Al aumentar la concentración de pK, el grado de resistencia de la PrP^{Sc} varía en función de la cepa[1].

En las enfermedades priónicas humanas diferentes fenotipos de la enfermedad se correlacionan con diferencias en el tamaño de la fracción resistente de la PrP^{Sc} a la pK y en el patrón de glicosilación, y por lo tanto, con diferentes conformaciones del prión [13]. Monari *et al.* en 1994, comparó la movilidad electroforética de las moléculas PrP^{Sc} asociadas al IFF y a ECJf y resultaron ser diferentes. Así mismo, un estudio de Parchi *et al.* en 1996 demostró que 2 formas de la proteína prión coexistían en la eECJ, la **tipo 1** y la **tipo 2**. La ECJ esporádica **tipo 1** consta de un fragmento no glicosilado (tras la digestión con pK) de 21 kDa y la de **tipo 2** de 19 kDa[4]. Asimismo, la iECJ y vECJ muestran diferentes perfiles de western blot [1](Fig. 5).

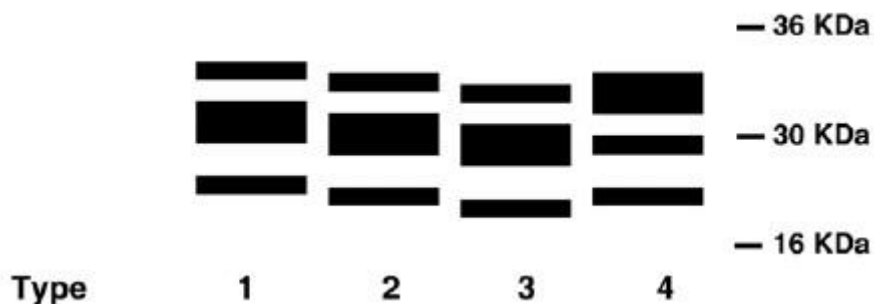


Fig. 5. Representación esquemática de los tipos de la PrP^{Sc} humana. Perfil de western blot tras la digestión con pK digestion. Los tipos 1 y 2 están asociados a la eECJ, el tipo 3 a la ECJi y el tipo 4 se encuentra exclusivamente en la vECJ [1].

Como se ha dicho anteriormente, los métodos de identificación de cepas priónicas descritos aquí son los clásicos y los más comúnmente utilizados, sin embargo, existen otros, no tan estudiados pero que constituyen nuevas herramientas que permiten estar cada vez más cerca de descubrir nuevas variables o características distintivas de cada cepa.

2.2. Factores implicados en la variación o diversidad de las cepas.

Las diferencias fenotípicas entre las enfermedades priónicas están influenciadas principalmente por la combinación de dos grandes variables:

- A) La estructura conformacional de la molécula PrP^{Sc} del agente infeccioso.
- B) El huésped que va a ser infectado por la isoforma infecciosa proteica.

Es decir, las distintas enfermedades priónicas resultan de las diferentes conformaciones de PrP^{Sc} que infectan a un determinado huésped y son susceptibles a modificaciones influenciadas por el mamífero infectado[10]. Entre las variables relacionadas con el huésped que influyen en la variabilidad de las cepas priónicas, el genotipo del gen *PRNP*, es el más importante. Sin embargo, existen otros cofactores celulares específicos de cada especie animal infectada que pueden también contribuir a la diversidad priónica (RNAs, glicosaminoglicanos, chaperonas y lípidos)[8]. Asimismo, la vía natural de transmisión *in vivo* o la ruta de inoculación elegida para inocular el aislamiento priónico en el huésped, la edad, el género y el estado del sistema inmune también pueden influir sobre el curso evolutivo de la enfermedad priónica, al igual que influyen en la evolución clínica de cualquier infección [16] (Fig. 6).

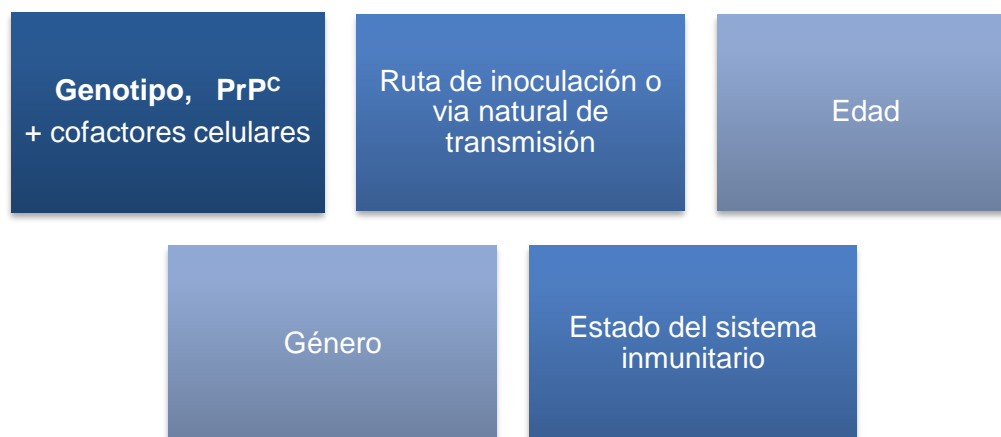


Fig.6. Principales variables dependientes del huésped que promueven la diversidad de las cepas priónicas.

Genotipo del gen *PRNP*

Los polimorfismos en el gen *PRNP*, codificador de la proteína priónica celular, fueron indirectamente descritos mucho tiempo atrás, en los primeros estudios experimentales que fundamentaron la hipótesis prión. Las diferencias entre los fenotipos “drowsy”, somnoliento y “scratchy”, rascador, presentes en la misma línea de ovejas infectadas fueron atribuidas a las diferencias polimórficas del huésped[13].

Más adelante se identificó el “gen Scrapie” determinante del p.i., que se le denominó “*sinc*”. Posteriormente se descubrió que el gen “*sinc*” era de hecho el gen codificador de PrP (gen *PRNP*) y en ratones, 2 polimorfismos en las posiciones 108 y 189 resultaban en diferencias en la proteína prión. La inoculación de estos ratones que presentaban estos dos tipos de polimorfismos con aislamientos priónicos provenientes de distintos mamíferos infectados originó una gran variedad de cepas priónicas (Tabla 2). De esta forma se detectó que cuando especímenes de una especie y línea determinada que presentan distintos polimorfismos para el gen *PRNP* se inoculan con el mismo aislado priónico, se producen variaciones en el p.i. de la enfermedad. Estos datos sugerían que los polimorfismos en la PrP^c favorecen la diversidad de cepas priónicas[13].

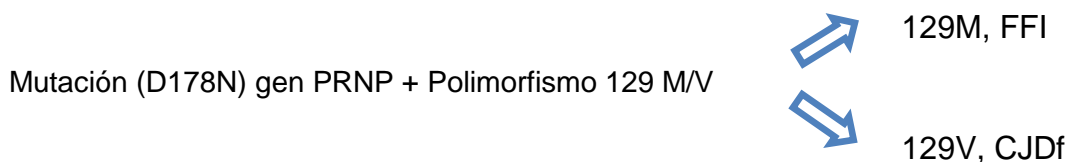
Tabla 2. Polimorfismos asociados a la diversidad priónica en ratones[13].

Fenotipo <i>PRNP</i> del ratón	Cepa de ratón	Cepa de prión	Polimorfismos asociados
prnp/sinc	C57	RML-ME7-	Leu-108
	RIII	139 ^a -301C-	Thr-189
	Swiss	22C-79A-	
	NZW	87A-	
	SJL		
prnp/sinc	VM	301V-22A-	Phe-108
	IM	87V-79V-	Val-189
prnp	Mai/Pas		Phe-108
	C57 MAI-Prnp		Thr-189

Evidentemente, los polimorfismos del gen *PRNP* no son exclusivos de los ratones y han sido identificados en la mayoría de las especies. Los polimorfismos del gen *PRNP* en humanos tienen una especial importancia en la enfermedad eECJ. El polimorfismo se sitúa en el codón 129 y puede presentar el triplete ATG o el GTG, dando lugar a **Metionina (Met)** o **Valina (Val)**[8]. La gran mayoría de los pacientes que presentan la eECJ son homocigóticos para Met [19]. Entre la población general este polimorfismo también es más frecuente, pero de forma mucho menos llamativa. Estos datos sugieren que ser homocigótico para la Met en la posición 129 nos hace más susceptibles a sufrir esta enfermedad[8]. Este polimorfismo también determina en la enfermedad eECJ el patrón de lesiones neuropatológicas presentadas, el perfil de glicosilación de la PrP^{Sc} resistente a las proteasas y la duración y severidad de la enfermedad [13]. Así, los pacientes con este polimorfismo presentan un curso clínico de la enfermedad más agresivo, de más corta duración y una afectación neuropatológica de las estructuras corticales [13].

La caracterización de la PrP^{Sc} en la eECJ llevó a la identificación de 2 tipos de fragmentos resistentes a la pK de la PrP^{Sc}, el tipo 1 y 2. Estos 2 tipos de PrP^{Sc} se pueden asociar con 3 posibles genotipos del gen *PRNP* determinados por el polimorfismo en el codón 129 (Met/Val), que da lugar a 6 posibles combinaciones entre estas 2 variables moleculares; cada una de estas combinaciones se correlaciona con un fenotipo clínico-patológico de la eECJ[8].

El polimorfismo en el codón 129 también está implicado en el IFF y la ECJf. Ambas enfermedades presentaban la misma mutación en el gen *PRNP* (D178N); la presencia de Met en la posición 129 da lugar a IFF, mientras que la presencia de Val daba lugar a ECJf. Esto indica que el polimorfismo M129V asociado a la mutación D178N puede determinar diferentes fenotipos de la enfermedad[3].



Toda esta información evidencia lo condicionante que resulta el propio genotipo del huésped para determinar las características propias de cada cepa priónica.

2.3. Características de las cepas priónicas

La hipótesis predominante es que la diversidad de las cepas priónicas está determinada por las conformaciones específicas de PrP^{Sc}. Este concepto es fundamental para comprender determinados aspectos importantes sobre las cepas priónicas como son los fenómenos de **adaptación**, **coexistencia de cepas** y **competición**.

Adaptación

Los aislamientos priónicos de una especie son normalmente menos infecciosos para otras especies, lo cual se evidencia por presentar estos nuevos huéspedes unos p.i. de la enfermedad ampliados, y una evolución clínica menos agresiva. Se cree que este fenómeno se debe a las distintas secuencias de aminoácidos de la proteína PrP^C, que consecuentemente dan lugar a una u otra conformación proteica. Esta conformación específica de la PrP^C del huésped será determinante para que el proceso de conversión, que es esencial para el desarrollo de la enfermedad priónica, tenga o no tenga lugar y con qué intensidad[4].

Tras sucesivas inoculaciones entre individuos de la misma línea, los tiempos de incubación van disminuyendo gradualmente, es decir tiene lugar un fenómeno de **adaptación**, que permite la estabilización de la cepa (enfermedad priónica con características fijas). En algunos casos la “barrera de la especie” es tan fuerte que algunos huéspedes no muestran sintomatología de la enfermedad tras la inoculación

priónica con aislamientos de otras especies. Sin embargo, se ha detectado que los aislamientos priónicos de los cerebros de estos huéspedes aparentemente resistentes pueden transmitir la enfermedad al ser inoculados en huéspedes susceptibles[4].

Para comprender mejor conceptos como el “fenómeno de adaptación” o “la barrera de la especie” podemos esquematizar distintos modelos de transmisión de la enfermedad priónica entre distintas especies según la figura 7.

- Partimos de un aislamiento priónico proveniente de una especie determinada, que denominaremos especie B. Este aislamiento será inoculado en 3 animales de distintas especies que denominaremos especie A, B y C. La especie B, por tanto, será la misma que la especie origen del aislamiento priónico.

- Al inocular el aislamiento priónico B en la **especie A**, el animal presentara un p.i. prolongado, que irá reduciéndose tras la sucesión de transmisiones seriadas en la misma línea de roedores A. De esta forma, el tercer pasaje presentará un p.i. menor que el segundo pasaje. Este ejemplo es representativo del fenómeno de adaptación.

- Distintamente, al inocular el aislamiento en una especie igual a la especie original, estaríamos en el segundo caso (**especie B**) el p.i. será reducido porque el agente priónico ya está adaptado a esta especie. De todas formas, si la PrP^C presentada por el mamífero de la especie B presentara polimorfismos, el p.i. sería largo, ya que supondría nuevos requerimientos adaptativos por parte del agente priónico para producir la enfermedad en el mamífero a pesar de ser de la misma especie.

- Finalmente, el último ejemplo, sería el presentado por la **especie C**, al inocular el aislamiento priónico en esta especie, las diferencias entre la de PrP^{Sc} y la de PrP^C son tan significativas que la enfermedad no se desarrollará, este fenómeno se debe a que la barrera de la especie en este caso es muy significativa.

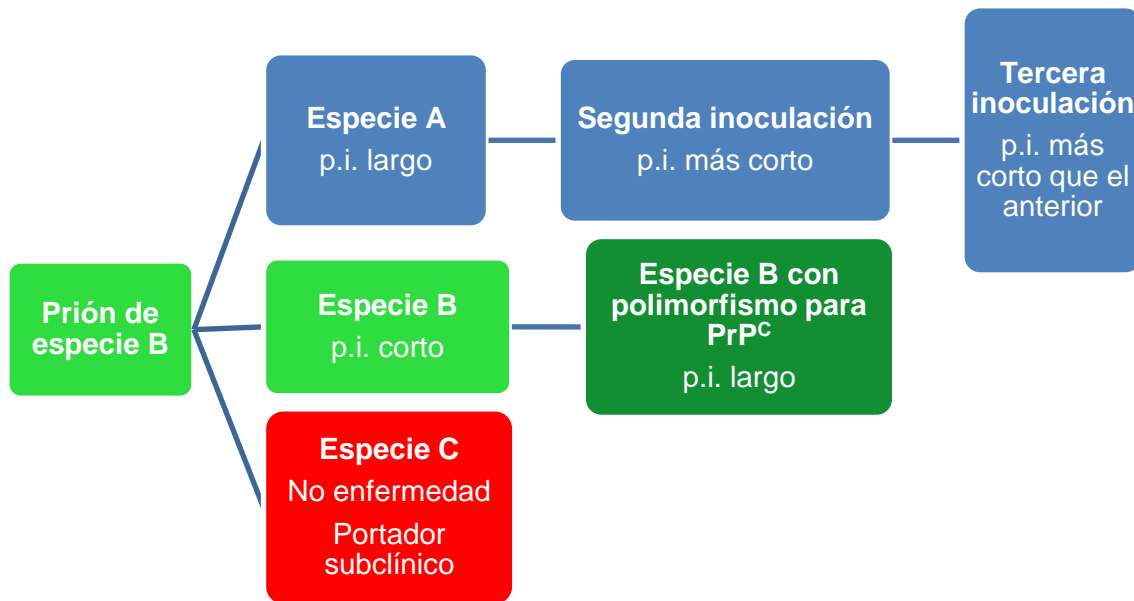


Fig. 7. Esquema sobre los modelos de variación de las cepas priónicas[4].

Coexistencia de cepas

Diversos estudios demuestran que en condiciones naturales, más de una cepa puede existir en un mismo huésped por lo que en un aislamiento priónico **coexisten** distintas conformaciones de PrP^{Sc} , y por tanto pueden originar en el huésped una enfermedad con disitintas características [2]. Al inocular al nuevo huésped una “mezcla priónica” de variantes conformacionales, una de todas ellas será la que se convertirá en dominante porque la interacción que resulte entre ella y la PrP^{C} del huésped será la más compatible. Por tanto el fenotipo de enfermedad que presente el huésped quedará determinado por la variante conformacional de de PrP^{Sc} dominante[2].

En el caso de la transmisión de ETV en hámster fueron necesarias 4 inoculaciones seriadas para su estabilización (Fig. 3). La estabilización en este caso suponía la adquisición por parte del nuevo huésped de un determinado patrón característico de la enfermedad (HY o DY). La primera inoculación destacó por unos tiempos de incubación muy alargados. Sin embargo, lo más llamativo es que tras las 3 primeras inoculaciones los hámsters presentaban unos síntomas que no eran característicos de HY ni de DY, sino una mezcla de ambas. Este fenotipo presentado se atribuye a la combinación de efectos de las dos cepas o variantes replicándose simultáneamente. En la cuarta inoculación cada cepa se estabilizó en algunos animales, mostrando ya un determinado fenotipo, HY o DY. Llegados a este punto las cepas ya pueden propagarse *in vivo* y las características de la enfermedad mantenerse[13].

La **ruta de transmisión** del agente priónico tiene especial relevancia ya que favorecerá a un tipo de conformación priónica u otra. Por ejemplo, dependiendo de si el huésped ha adquirido la enfermedad priónica a partir de inoculación cerebral o bien de una forma más natural, por vía oral, puede desarrollar un fenotipo de enfermedad diferente. Parece que la transmisión por vía oral del agente infeccioso, en la mayoría de las ocasiones, favorece la selección de un determinado tipo de cepa sobre el otro. Este fenómeno no tiene lugar si la infección se produce por inoculación cerebral o por ruta intraocular, en la que un tipo u otro será el dominante, sin presentar relación con la ruta de transmisión[2].

La explicación reside posiblemente en que en la transmisión por vía oral, la progresión del agente infeccioso por el organismo se ve limitada por el sistema linforetico asociado al tracto gastrointestinal. De esta forma sólo las variantes conformacionales que no sean susceptibles a este sistema serán capaces de propagarse. Como puede observarse en la figura 8, las conformaciones tipo 2 serán inevitablemente dominantes y en el huésped tendrá lugar la enfermedad con las características fenotípicas de la enfermedad tipo 2, si la vía de transmisión es oral[2].

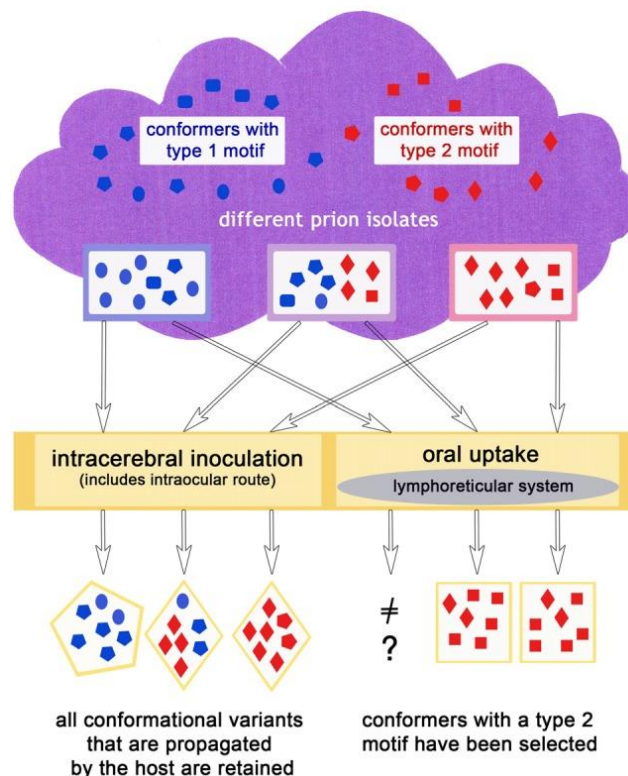


Fig. 8. Influencia de la ruta de infección en la selección de la variante conformacional dominante en el huésped[7].

En el caso de la ECJi, las manifestaciones clínicas son distintas en función de la forma de transmisión de la enfermedad. En la transmitida por injerto de duramadre, la clínica es muy similar a la presentación de la eECJ (forma mioclónica). Sin embargo, en la infección periférica con hormona de crecimiento, la enfermedad se caracteriza por la aparición temprana del síndrome cerebeloso, que afecta en primer lugar a la marcha y las mioclonías aparecen más tarde[20].

Competición

En condiciones experimentales particulares algunas cepas priónicas pueden ampliar su p.i. específico cuando el huésped al que infectan es coinfectado con otra cepa priónica distinta [13]. De esta forma los priones con largos p.i. pueden aumentar los p.i. propios de los priones “más rápidos.”

Este fenómeno de competición ha sido estudiado en numerosos experimentos a partir de hámsters y ratones. Uno de los experimentos más representativos utilizó 2 cepas priónicas que presentaban distintos p.i. La cepa 22A que presentaba un p.i. corto y la cepa 22C que presentaba un p.i. largo. Las cepas con un p.i. largo (22A) fueron inoculadas en ratones previamente infectados con las cepas que presentaban un p.i. corto (22C). Los resultados mostraron que los ratones sólo presentaban las características típicas de 22A, es decir, p.i. largo y un determinado patrón lesional neuropatológico. Esto sugirió que la otra cepa priónica “rápida” había sido de alguna forma degradada [13].

Otros estudios describieron fenómenos similares detectados, esta vez con las variantes fenotípicas HY y DY. Los resultados arrojaron nuevos datos, el principal fue que el proceso de competición sólo tenía lugar si el aislamiento priónico DY se inoculaba directamente en un nervio del huésped (evidentemente previamente infectado por la variante priónica HY)[21]. Esto sugería que el fenómeno de competición solo se produciría en tejidos nerviosos periféricos, pero no en el SNC [13].

Este fenómeno supone una interesante vía de investigación en la búsqueda de estrategias terapéuticas contra las enfermedades priónicas, ya que permite prolongar artificialmente el p.i. Así, cepas priónicas con largos p.i. podrían ser utilizadas para enlentecer la replicación de enfermedades priónicas con curso evolutivo rápido y letal como EEB o vECJ.

3. CEPAS PRIÓNICAS SINTÉTICAS

Como se ha explicado anteriormente son numerosas las evidencias que indican que las propiedades de cada cepa están determinadas por la conformación de la isoforma patológica, sin embargo, ni su estructura terciaria ni el mecanismo molecular responsable de la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} se conocen completamente [22].

Actualmente se contemplan dos hipótesis para explicar la conversión conformacional de la PrP^{C} en PrP^{Sc} : 1) el modelo de plegamiento asistido por molde, el cual propone que la PrP^{Sc} actúa como un molde para que la PrP^{C} se convierta en PrP^{Sc} ; 2) la teoría de nucleación sembrada, en la que se sugiere que ambas isoformas se encuentran en estado de equilibrio, de forma que en un hospedador sano el equilibrio se desplaza ampliamente hacia la PrP^{C} . Según esta teoría, en un individuo afectado, varias moléculas de PrP^{Sc} formarían un núcleo o semilla al cual se irían uniendo más moléculas formando agregados altamente ordenados de tipo amiloide, los cuales serían capaces de inducir un cambio masivo sobre las moléculas normales de PrP^{C} , convirtiéndolas en moléculas de conformación anómala. Finalmente estos agregados se fragmentan dando lugar a numerosos nuevos núcleos o semillas, lo que conlleva a un aumento exponencial de la PrP^{Sc} [23].

Con el objetivo de comprender mejor estos mecanismos, se han llevado a cabo líneas de investigación dirigidas hacia la creación de cepas priónicas sintéticas. Una herramienta fundamental para la creación de cepas priónicas *de novo* es la técnica de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (Protein Misfolding Cyclic Amplification; PMCA) que permite la transformación de grandes cantidades de PrP^{C} en PrP^{Sc} partiendo de cantidades ínfimas de la isoforma patógena [22](Fig. 9). La técnica PMCA se asemeja a la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, procedimiento tal vez más conocido por el cual se obtienen numerosas copias de una región de ADN a partir de pequeñas cantidades de éste. La principal utilidad de esta técnica reside en que permite a los investigadores emular los aspectos esenciales de la replicación *in vivo* de los priones.

La PMCA se fundamenta en la teoría de nucleación sembrada. Se parte de un homogenizado cerebral con PrP^{C} en mucha cantidad, que se incuba junto con ínfimas cantidades de proteína patológica. A continuación, tiene lugar un proceso de

“conversion/replicación” a partir del cual las cantidades de proteína patológica irán aumentando progresivamente con ciclos de incubación-sonicación, que se repiten secuencialmente. Este fenómeno en gran parte es posible por la técnica de sonicación, debido a que la aplicación de ultrasonidos a los agregados priónicos hace que estos se rompan y queden más “núcleos infecciosos” libres para que la amplificación de la PrP^{Sc} se produzca de forma más eficiente [22]. De esta manera se obtienen cantidades priónicas mucho mayores a las de la muestra original y la infectividad también se incrementa. La obtención de cantidades de proteína patológica tan grandes permite la determinación de los niveles de PrP^{Sc} por cualquier técnica bioquímica y facilita su estudio[25]. Además, mediante la sonicación, es posible acelerar el proceso de conversión de PrP^{C} a PrP^{Sc} . De esta forma la replicación priónica tiene lugar a una velocidad mucho mayor a la esperada *in vivo*, lo cual es imprescindible para que el proceso de investigación sea productivo [23].

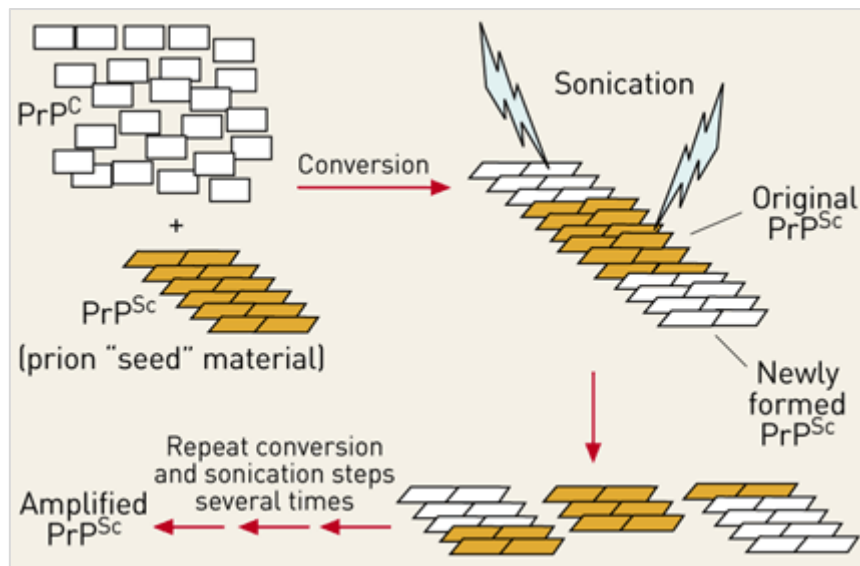


Fig.9. Esquematización sobre el mecanismo básico de conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} de la técnica PMCA [24].

Al inocular los agregados priónicos sintéticos obtenidos por PMCA en animales de experimentación éstos pueden desarrollar la enfermedad, debido a que el cambio conformacional de PrP^{C} a PrP^{Sc} se ha perpetuado en estos agregados priónicos creados *de novo*.

Castilla y colaboradores fueron los pioneros en generar moléculas priónicas infecciosas *de novo* a partir de la técnica PMCA. Homogeneizados de cerebros infectados por una forma adaptada de Scrapie, la cepa de prión 263K, fueron

sometidos a 20 ciclos de PMCA en presencia de PrP^C. A pesar de que no había moléculas de PrP^{Sc} del inóculo original en las muestras amplificadas *in vitro*, sus propiedades bioquímicas y estructurales presentaron las mismas características que los priones 263K. Más concretamente, las muestras amplificadas eran resistentes a la pK, insolubles en detergentes no desnaturalizados y ricos en conformación hoja beta. Los animales inoculados con las formas pK resistentes de estas muestras contrajeron Scrapie y murieron. Para verificar que las formas pK resistente *in vitro* era estables en el tiempo, realizaron sucesivas transmisiones seriadas en animales, que igualmente mostraron disfunciones neurológicas y murieron[25].

Uno de los principales intereses de generar priones *in vitro* es que supondría la demostración de la hipótesis de que los priones son únicamente proteínas debido a que sería posible generar priones sintéticos a partir de PrP recombinante altamente purificada (recPrP). Los resultados de las investigaciones de Castilla *et al* a partir de la técnica PMCA refuerzan esta hipótesis, aunque algunos estudios anteriores utilizando otras técnicas no tan punteras como la PMCA también apoyan esta hipótesis. Legname *et al* demostró que la recPrP pura puede ser convertida *in vitro* en una forma estructural similar a los priones [25]. Generó priones recombinantes infecciosos para ratones (MoPrP) y los convirtió en fibras amiloides que fueron inoculadas en ratones transgénicos (Tg9949) modificados genéticamente para ser más susceptibles a la infección por MoPrP. Los ratones transgénicos desarrollaron la enfermedad. También, el estudio de los homogeneizados cerebrales de éstos, demostró resistencia de las partículas priónicas a la digestión por pK [26]. Otra prueba del éxito de los resultados fue que tras transmisiones seriadas de estos homogeneizados cerebrales de los ratones transgénicos enfermos en ratones salvajes sanos, éstos desarrollaron la enfermedad. Estos resultados demostraron que la generación de priones sintéticos *de novo* era posible y dieron fuerza a la hipótesis de que los priones son únicamente proteínas [26].

Otro de los puntos de interés en la creación de moléculas de PrP^{Sc} *in vitro* es la identificación de cofactores de propagación, moléculas que participarían en la propagación endógena de PrP^{Sc} al regular de una u otra forma la conformación infecciosa de estas proteínas priónicas. La totalidad de estos cofactores todavía se desconoce sin embargo, diversas hipótesis sostienen que moléculas como el RNA o distintas variantes de lípidos como la fosfatidiletanolamina (PE) podrían actuar como tales [22]. El proceso de identificación de los factores de propagación endógena de

PrP^{Sc} consistió en degradar mediante tratamientos bioquímicos distintas moléculas de homogeneizados cerebrales de hámsters y ver cómo esto afectaba al proceso replicativo priónico. Se detectó que la degradación selectiva de RNA monocatenario en los homogeneizados inhibía la amplificación de las moléculas de PrP^{Sc}. Estos resultados sugieren que, en cepas priónicas que afectan a hámsters el RNA puede actuar como factor de propagación [25]. También fue detectada la actividad de PE como cofactor, a partir de estudios basados en la técnica PMCA [22].

Más adelante y siguiendo esta línea de investigación nuevas evidencias sugirieron el rol esencial de los cofactores en el mantenimiento de la conformación infecciosa de PrP^{Sc} y por tanto de su infectividad. Dos líneas seriadas de propagación por PMCA fueron procesadas en paralelo. Una contenía una mezcla de sustratos con PrPrecombinante (recPrP) y fosfatidiletanolamina (PE), es decir, incluía el supuesto cofactor. La otra contenía exclusivamente recPrP, sin cofactor[23]. Tras su propagación mediante PMCA las conformaciones de PrP^{Sc} provenientes de ambas series fueron distintas. Sin embargo, lo más llamativo fue la comprobación de que la PrP^{Sc} proveniente de la línea sin cofactor era no infecciosa en ratones salvajes, a diferencia de las moléculas de PrP^{Sc}-PE producidas en paralelo que si mostraron infectividad. De esta forma se confirmó que las moléculas de proteínas por si solas son incapaces de mantener la conformación infecciosa de los priones de los mamíferos[23].

Recientemente se ha demostrado la capacidad para modificar experimentalmente el fenotipo de cepas priónicas, alterando la conformación de PrP. Las moléculas de recPrP plegadas en distintas conformaciones de amiloide dan lugar a distintas cepas priónicas, con periodos de incubación que dependen de la estabilidad conformacional de los amiloides de recPrP. Es decir, el poder modificar *in vitro* la conformación de los agregados amiloides mediante procesos bioquímicos permite la creación de distintas cepas priónicas, pues como ya ha sido comentado, el principal determinante fenotípico es la conformación estructural de PrP [27].

Igualmente, se ha demostrado una correlación evidente entre la estabilidad de las fibras de amiloide de las cepas priónicas y los p.i. [28]. La relación es indirectamente proporcional, es decir, a mayor estabilidad de las fibras amiloides, la cepa es menos infecciosa presentando los periodos de incubación más largos y de forma inversa, menor estabilidad de las fibras amiloides, menor periodo de incubación de la enfermedad y mayor infecciosidad [18].

La habilidad para generar preparaciones de priones infecciosos de alta calidad a partir de proteínas recombinantes y controlar sus propiedades es muy probable que posibilite la ampliación de los conceptos hasta ahora poco conocidos sobre la estructura y mecanismo biológico de los priones [26]. De igual manera, estos conocimientos podrían aportar datos interesantes en la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas para estas enfermedades priónicas (hasta el momento incurables) y para otros desórdenes neurodegenerativos de mecanismos patológicos similares [23].

4. CEPAS PRIÓNICAS vs TIPOS PRIÓNICOS.

Como hemos visto anteriormente, las diferencias fenotípicas entre las enfermedades priónicas están influenciadas por la combinación de dos grandes variantes: la estructura conformacional de la molécula PrP^{Sc} del agente infeccioso y el huésped. Los conceptos de tipo y cepa priónica están claramente relacionados principalmente con estas dos variantes, pero la evidencia científica aporta datos mucho más complejos y existe cierta confusión al usar una u otra terminología.

Una muestra cerebral de un mamífero enfermo de una EET contiene diferentes variantes conformacionales de la PrP^{Sc} , una de las cuales será la dominante en el aislamiento, por haberse adaptado o ser más afín a las características del medio del huésped. Estas diferentes variedades conformacionales de PrP^{Sc} hacen referencia a lo que designamos como tipos priónicos. Por tanto, en un mismo aislamiento priónico proveniente del huésped original encontraremos distintos tipos priónicos, si bien uno será el dominante [2].

Las cepas surgirán posteriormente, cuando inoculemos el aislamiento del huésped original con un determinado tipo priónico predominante, a nuevas especies huésped. Entonces las variantes conformacionales o tipos priónicos serán sometidas a pequeñas modificaciones determinadas por el huésped (la PrP^{C} , pequeños RNAs, polisacáridos y lípidos) y en última instancia podrían dar lugar a una cepa. Por tanto, un único tipo priónico extraído del huésped original al que ha infectado puede dar lugar a distintas cepas tras ser inoculado en nuevas especies huésped debido a la intervención de características genómicas del mamífero [2].

El concepto de tipo priónico se define como una determinada conformación estructural del prión que determina rasgos clínicos clave de la enfermedad y un perfil lesional neurológico determinado en el huésped original. También determina los patrones de acumulación de los agregados priónicos, el tamaño de los agregados y la estabilidad a la desnaturalización. Igualmente condiciona los distintos sitios de unión a la enzima pK, que resultan en diferentes perfiles de Western Blot [2]. Estas características se mantienen tras la transmisión del aislamiento priónico a un nuevo huésped y pueden dar lugar tras inoculaciones sucesivas a distintas cepas. Esto dependerá de los cambios conformacionales menores producidos por la interacción del tipo priónico del aislamiento original y los factores determinados por el huésped[2].

Generalmente, los huéspedes genéticamente distintos darán lugar a distintas cepas, ya sean inoculados con el mismo o distinto tipo priónico. Ejemplo de este fenómeno a partir del cual un tipo priónico puede dar lugar a distintas cepas es el Scrapie clásico que ha producido muchas cepas diferentes en la misma línea de ratones [13]. Sin embargo, la EEB es bastante única porque produce las mismas dos cepas priónicas en ratones de distintas líneas. En el caso de la eECJ es difícil determinar cuántas cepas podrían derivar, pues no existe un animal susceptible para todos los fenotipos de ECJ esporádica humana[2].

Un uso incorrecto de la terminología genera conclusiones incorrectas y es aquí donde radica su importancia.

5. CONCLUSIÓN

Inicialmente, la identificación de cepas priónicas parecía estar en conflicto con la hipótesis de que el prión es sólo una proteína (Prusiner, 1982) debido a que, entre la comunidad científica de aquella época, la única razón plausible que explicara la existencia de cepas era que el agente infeccioso contara con material genético en su composición. La idea de que una partícula protéica fuera la responsable de esta variabilidad fenotípica resultaba poco convincente. Decadas después y fruto de numerosas investigaciones en este campo, la teoría propuesta por Prusiner está prácticamente aceptada de forma generalizada y constituye la base de sustentación de numerosas hipótesis actuales sobre la naturaleza de las cepas priónicas. La creencia más generalizada relacionada con el fenómeno de las cepas priónicas es que el origen de esta variabilidad reside en las distintas estructuras terciarias que la PrP^{Sc} puede

adquirir. Estas variantes conformacionales de la proteína patológica determinan características básicas del fenotipo de la enfermedad como son el perfil molecular y neuropatológico y consecuentemente las manifestaciones clínicas [8]. Sin embargo, el fenómeno de las cepas priónicas no es tan sencillo y factores dependientes del huésped son también responsables de esta variabilidad. Estos son: el genotipo (PrP^C), la ruta de inoculación o vía natural de transmisión, la edad, el sexo y el estado del sistema inmunitario[3].

A pesar de estos progresos son muchas las preguntas todavía sin responder como por ejemplo, ¿Cuáles son las bases estructurales de las cepas priónicas?, ¿Cuál es el mecanismo que permite que el fenómeno de adaptación de cepas tenga lugar?, ¿Cómo puede toda esta información almacenarse en la conformación priónica?

También, diversos estudios experimentales aportan resultados sorprendentes, cuya comprensión todavía supone un reto para los investigadores, entre ellos destaca el que la transmisión de algunas cepas priónicas como la EEB a especies animales intermediarias puede dar lugar a nuevos aislamientos priónicos con potenciales zoonóticos impredecibles [1].

De todas estas cuestiones sin resolver, tal vez la principal incógnita sea cómo una secuencia primaria idéntica puede derivar en distintas conformaciones terciarias en la proteína priónica, si no existen otras moléculas portadoras de información. En esta dirección es hacia donde avanzan las investigaciones más punteras en el campo de los priones. A partir de nuevas técnicas como la PMCA se ha conseguido crear cepas priónicas sintéticas *de novo*. A su vez estos recientes avances han permitido identificar moléculas *in vitro* (ARN, PE) que podrían actuar como cofactores en la replicación priónica y posiblemente tengan un rol fundamental en el mantenimiento de la conformación infecciosa de PrP^{Sc}[24].

Bibliografía

- [1] Morales R. Prion strains in mammals: Different conformations leading to disease. *PLoS Pathog.* 2017;13(7)
- [2] Wemheuer WM, Wrede A, Schulz-Schaeffer WJ. Types and strains: their essential role in understanding protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci.* 2017;9(187)
- [3] Solforosi L, Milani M, Mancini N, Clementi M, Burioni R. A closer look at prion strains: characterization and important implications. *Prion.* 2013;7(2):99–108.
- [4] Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M. Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:552–561.
- [5] Fehlinger A, Wolf H, Hossinger A, Duernberger Y, Pleschka C, Riemschoss K, Liu S, Bester R, Paulsen L, Priola SA, Groschup MH, Schätzl HM, Vorberg IM. Prion strains depend on different endocytic routes for productive infection. *Sci Rep* 2017; 7:6923
- [6] Tuñón T, Bragado FG, Casanova J, Manubens JM. Protocolos de diagnóstico en los bancos de cerebros. V Congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológica conganat. 2012
- [7] Aguzzi A, Baumann F, Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* 2008;31:439–477.
- [8] Poggiolini I, Saverioni D, Parchi P. Prion protein misfolding, strains, and neurotoxicity: an update from studies on mammalian prions. *Int J Cell Biol.* 2013;2013:(910314)
- [9] Requena JR, Wille H. The structure of the infectious prion protein. *Pathogens.* 2014;8:60–66.
- [10] Hill AF, Collinge J. Prion strains and species barriers. *Contrib Microbiol.* 2004;11:33–49.

- [11] Schneider K, Fangerau H, Michaelsen B, Raab WH. The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull.* 2008;77:343–55.
- [12] Farías G, Garces H, Larenas J, Ramirez A, Lecocq C. Enfermedades Producidas Por Priones en los Animales. *Av. cienc. vet.* 2011;26:1
- [13] Morales R, Abid K, Soto C. The prion strain phenomenon: Molecular basis and unprecedented features. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(6):681–691.
- [14] Head MW, Ironside JW. Creutzfeldt-jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2012;38:296–310.
- [15] Badiola JJ, Pumarola M. Encefalopatías espongiformes transmisibles. 1º ed. Barcelona: Mayo S.A.; 2010
- [16] Bartz JC. Prion Strain Diversity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6
- [17] Bessen RA, Marsh RF. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol.* 1992;66(4):2096–101.
- [18] Ayers JI, Schutt CR, Shikiya RA, Aguzzi A, Kincaid AE, Bartz JC, et al. The strain-encoded relationship between PrP replication, stability and processing in neurons is predictive of the incubation period of disease. *PLoS Pathog.* 2011;7
- [19] Asante EA, Smidak M, Grimshaw A, Houghton R, Tomlinson A, Jeelani A, et al. A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease. *Nat.* 2015;522:478–481.
- [20] Haïk S, Brandel J. P. Infectious prion diseases in humans: Cannibalism, iatrogenicity and zoonoses. *Infection, Genetics and Evolution.* 2014.26:303-312.
- [21] Shikiya RA, Ayers JI, Schutt CR, Kincaid AE, Bartz JC. Coinfecting prion strains compete for a limiting cellular resource. *J. Virol.* 2010;84:5706–5714.
- [22] Supattapone S. Synthesis of high titer infectious prions with cofactor molecules. *J Biol Chem.* 2014;289:19850–19854.

- [23] Colby DW, Prusiner SB. De novo generation of prion strains. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:771–777.
- [24] Borman S. PCR for prions: Amplification technique improves prospects for diagnostic tests. *Cenear.* 2011;79(25)
- [25] Benetti F, Geschwind MD, Legname G. De novo prions. *F1000 Biol Rep.* 2010;2:46
- [26] Elezgarai SR, Fernández-Borges N, Erana H, Sevillano A, Moreno J, Harrathi C, et al. Generation of a new infectious recombinant prion: A model to understand gerstmann–sträussler–scheinker syndrome. *Sci Rep.* 2017;7:9584
- [27] Vanik DL, Surewicz KA, Surewicz WK. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell.* 2004;14:139–145.
- [28] Jones EM, Surewicz WK. Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell.* 2005;121:63–72.