

## VIROIDOLOGÍA Y EVOLUCIÓN MOLECULAR

Gabriel Bedoya B.

Los viroides, constituidos por ácidos nucleicos, son las moléculas más pequeñas, con capacidad de replicación, que se conocen hasta el presente y han adquirido gran importancia debido a su impacto económico en cultivos vegetales y a su utilidad como modelos para el análisis filogenético de ácidos nucleicos. A pesar de que su nombre sugiere un parecido con los virus, esto se debe más a un error histórico, dado el momento de su descubrimiento, 1971; ahora se sabe que se trata de entes biológicos muy diferentes, tanto en la cantidad de su material genético, como en la expresión.

Estos agentes, no poseen características esenciales que los relacionen filogenéticamente con los virus clásicos y aún más, se agrupan aparte de virus primitivos, como los virus satélites y los virusoides. Se llama virus satélites a aquellos que requieren un virus ayudador para su replicación y pueden ser de dos tipos; unos son semejantes a los viroides, que son los llamados SatRNAs y otros que son verdaderos satélites como el caso de los dependovirus, que son de DNA y entre los cuales se encuentran los parvovirus asociados a los adenovirus. Los Virusoides tienen características de viroide y de satRNA, en cuanto a la estructura del genoma, pero requieren de glicoproteínas de envoltura que aporta el virus ayudador. El único ejemplo de estos últimos, hasta el momento, es el virus de la hepatitis Delta que utiliza al virus de la hepatitis B del hombre o de la marmota.

Con este capítulo, queremos cubrir dos aspectos fundamentales de la microbiología: por un lado el tema de los viroides y sus parientes, los virus satélites (satRNAs) y por el otro el de la evolución molecular de los ácidos nucleicos como agentes vivos.

A pesar de que se conocen las secuencias de muchos viroides y con estas se ha buscado la relación filogenética con otros agentes, tales como los satRNAs y el virus de la hepatitis D, se carece de respuestas concretas para varias pre-

guntas fundamentales como el origen evolutivo y los mecanismos de replicación e infección.

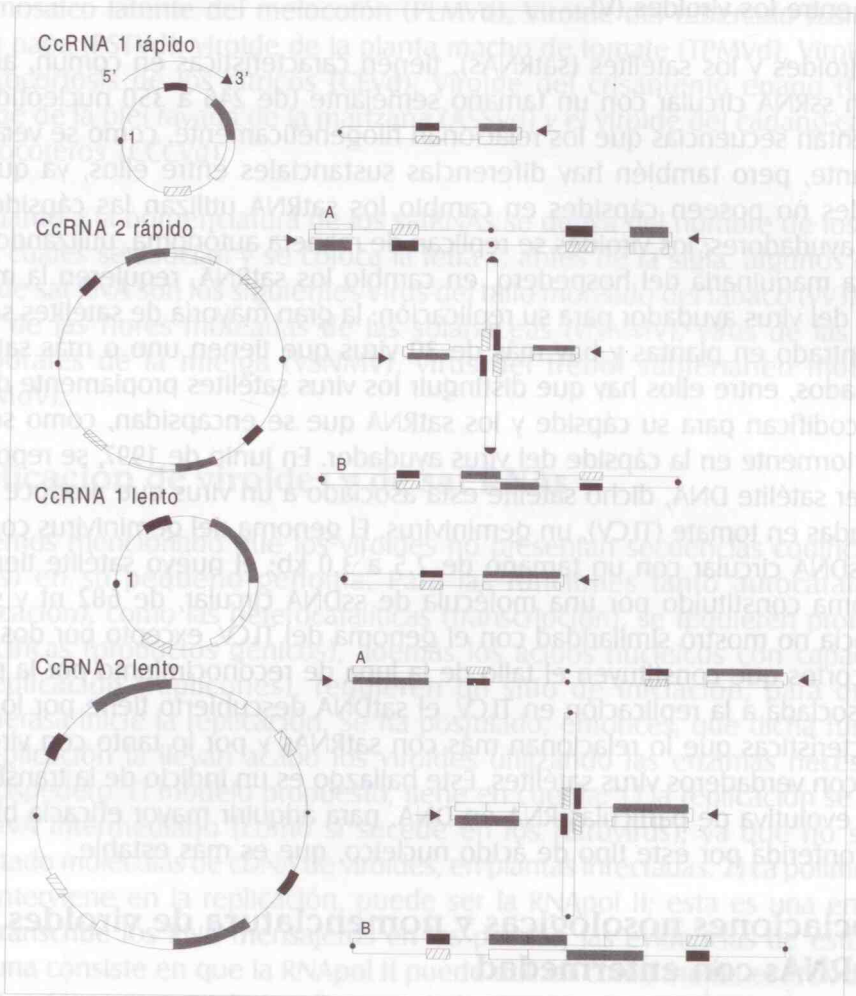
El aumento de epifitias producidas por viroides, desde su descubrimiento en 1971 por Diener, ha hecho pensar a los especialistas que las enfermedades de plantas producidas por estos agentes, es un problema del siglo XX y más específicamente de los últimos 20 años. Existen dos explicaciones posibles para este fenómeno; una podría ser la aparición de novo de estos agentes a partir de mutaciones de moléculas de RNA celular como los intrones o secuencias de transposición con las cuales han presentado algunas secuencias homólogas. Otra explicación más probable que la primera, es que estos agentes hayan existido previamente en hospederos naturales (silvestres) y por ende no habían sido detectados por el hombre. Una evidencia para este último razonamiento, son los casos de los viroides, PSTVd, que produce el tubérculo fusiforme en la papa y TPMVd, del tomate macho, para los cuales se han encontrado plantas silvestres infectadas con viroides semejantes.

El paso de viroides de especies silvestres a especies domésticas y la consecuente aparición de epifitias, podrían explicarse por los cambios ecológicos involucrados en la explotación industrial de los cultivos vegetales; en grandes densidades, con genomas de escasa variabilidad genética, lo que confiere alta susceptibilidad y unido a esto la apertura de las economías que llevan consigo la posibilidad de diseminar agentes infecciosos en forma global.

### **Características estructurales de viroides y de SatRNAs**

Los viroides son moléculas de RNA con un tamaño que tiene un rango entre 246 a 375 nucleótidos y un peso molecular entre 1,1 y  $1,7 \times 10^5$  daltons. Los virus más pequeños, como el bacteriófago phi X 174, que tiene un genoma de DNA de cadena simple circular (ssDNAC), tiene un tamaño de 5400 nucleótidos y  $1,8 \times 10^6$  daltons, lo cual indica que los viroides son casi 20 veces más pequeños que los virus de menor tamaño. En las secuencias de los viroides no se han encontrado marcos de lectura abierta (ORFs), lo cual significa que no codifican para proteínas, es decir carecen de genes; la molécula es RNA de cadena simple y circular (ssRNACcc) e internamente presentan dominios que se aparean debido a secuencias palindrómicas (repeticiones invertidas); lo que les confiere una forma semejante a un rodillo, dado por las hélices internas en las regiones de apareamiento. En las regiones donde no se lleva a cabo apareamiento se forman asas que son conservadas en el genoma del viroide. Los viroides presentan polimorfismos en tamaño, como es el caso del viroide que produce la enfermedad de Cadang-cadang, en palmas de coco, en el cual se han aislado dos diferentes tamaños de genoma básicos (monoméricos), uno de 287 nucleótidos (electroforéticamente lento) y otro de 246 (rápido), y cada uno puede además presentarse en forma dimérica de 574 y 492 nucleótidos respec-

tivamente, los genomas monoméricos presentan la forma tradicional de rodillo que tienen los viroides, en cambio los diméricos como el de 574 (lento 2), presenta 41 nt adicionales, que son secuencias repetidas, en uno de los extremos y, a pesar de que su forma termodinámicamente más estable es la de rodillo, puede conformarse de manera cruciforme (figura 1).



**Figura 1:** Representación esquemática de las estructuras predichas de 4 tipos de ccRNAs encontrados en células infectada. En las formas circulares las cajas oscuras representan secuencias altamente conservadas entre los ccRNAs de los viroides. Las cajas blancas y las rayadas presentan secuencias duplicadas entre las formas lentas y rápidas (denominadas así por su migración en electroforesis). Las formas lentas se diferencian de las rápidas en que las primeras tienen mayor tamaño; las formas 1 se diferencian de las 2, en que las 1 son monómeros y las 2 son dímeros. En los esquemas A y B, se representan las diferentes conformaciones (conformómeros) que adquieren las formas circulares cuando se aparean secuencias homólogas para adquirir una estructura terciaria en forma de doble hélice tipo A.

La estructura terciaria de los viroides (forma de rodillo), presenta regiones bien definidas que determinan cinco dominios estructurales: terminales izquierdo (TL) y derecho (TR); dominio que parece ser responsable de la patogenicidad (P); dominio central formado por una secuencia que aparece en todos los viroides (conservada) (CCR) y un dominio donde se presenta la mayor variabilidad entre los viroides (V).

Los viroides y los satélites (satRNAs), tienen características en común, ambos poseen ssRNA circular con un tamaño semejante (de 246 a 350 nucleótidos) y presentan secuencias que los relacionan filogenéticamente, como se verá más adelante, pero también hay diferencias sustanciales entre ellos, ya que los viroides no poseen cápsides en cambio los satRNA utilizan las cápsides de virus ayudadores; los viroides se replican de manera autónoma, utilizando para ello la maquinaria del hospedero, en cambio los satRNA, requieren la maquinaria del virus ayudador para su replicación; la gran mayoría de satélites se han encontrado en plantas y hay más de 30 virus que tienen uno o más satélites asociados, entre ellos hay que distinguir los virus satélites propiamente dichos que codifican para su cápside y los satRNA que se encapsidan, como se dijo anteriormente en la cápside del virus ayudador. En junio de 1997, se reportó el primer satélite DNA, dicho satélite esta asociado a un virus que produce hojas curvadas en tomate (TLCV), un geminivirus. El genoma del geminivirus consiste en ssDNA circular con un tamaño de 2.5 a 3.0 kb; el nuevo satélite tiene un genoma constituido por una molécula de ssDNA circular, de 682 nt y su secuencia no mostró similitud con el genoma del TLCV, excepto por dos motivos cortos que constituyen el tallo de la lupa de reconocimiento por la proteína asociada a la replicación en TLCV, el satDNA descubierto tiene por lo tanto características que lo relacionan más con satRNAs y por lo tanto con viroides, que con verdaderos virus satélites. Este hallazgo es un indicio de la transformación evolutiva de partículas RNA en DNA, para adquirir mayor eficacia biológica, conferida por este tipo de ácido nucleico, que es más estable.

### **Asociaciones nosológicas y nomenclatura de viroides y de sat RNAs con enfermedad**

Las plantas infectadas por viroides presentan síntomas tales como: tubérculos fusiformes, enanismo, clorosis, palidez en frutos, manchas, caquexia y la enfermedad conocida como cadang-cadang en palmas de coco. Los satRNAs, por su parte, pueden exacerbar los síntomas de los virus a los cuales están asociados o inducir síntomas un poco diferentes a ellos, y además como algunos de los satRNAs interfieren con la replicación del ayudador pueden disminuir los síntomas producidos por estos, los mecanismos moleculares que permitan dilucidar la inducción de enfermedad por estas partículas es todavía un tema de especulación.

Los nombres de viroides se derivan de los síntomas que producen y el nombre de la planta que infectan, en la sigla que los identifica se acostumbra colocar una d al final, para significar que es un viroide y en cuanto a los satRNAs, su nombre se deriva del virus ayudador, unos pocos ejemplos de viroides son los siguientes: Viroide del manchado aguacate (ABSVD), Viroide del mosaico latente del melocotón (PLMVD), Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (PSTVD), viroide de la planta macho de tomate (TPMVD), Viroide de la exocortosis de los cítricos (CEVD), Viroide del crisantemo enano (CSVd), viroide de la piel rayada de la manzana (ASSVD) y el viroide del cadang-cadang en cocoteros (CCCVd).

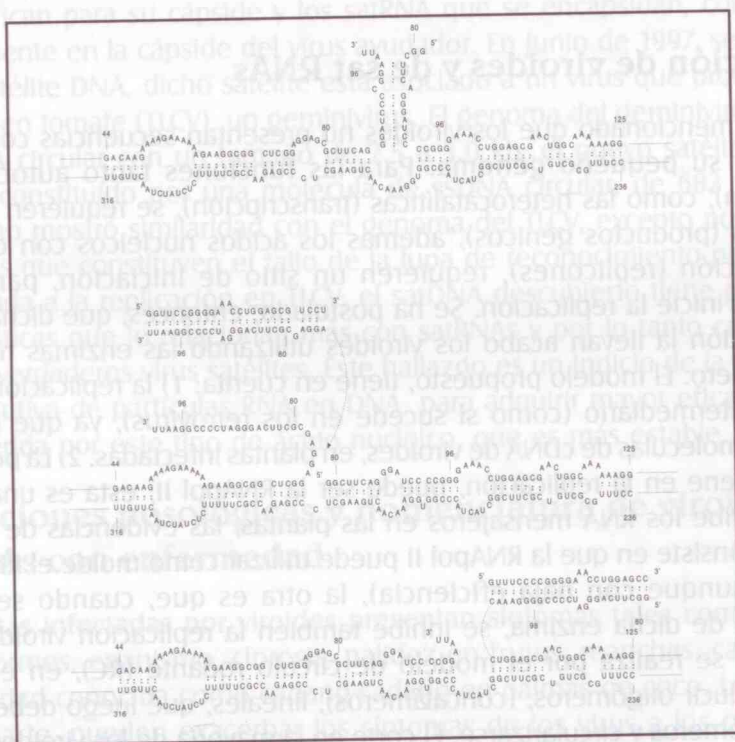
En cuanto a la nomenclatura de los satRNAs se deriva del nombre de los virus a los cuales se asocian y se coloca la letra v, antes de la sigla, algunos ejemplos de sat RNA son los siguientes Virus del tallo moteado del tabaco (VTMoV), virus de las flores moteadas de las solanáceas (vNNMV), virus de las listas temporales de la mielga (vSNMV), virus del trébol subterráneo moteado (vSCMoV).

## Replicación de viroides y de sat RNAs

Ya hemos mencionado que los viroides no presentan secuencias codificantes (ORFs) en su pequeño genoma. Para las funciones tanto autocatalíticas (replicación), como las heterocatalíticas (transcripción), se requieren proteínas específicas (productos génicos), además los ácidos nucleicos con capacidad de replicación (replicones), requieren un sitio de iniciación, para que la polimerasa inicie la replicación. Se ha postulado, entonces, que dicha función de replicación la llevan a cabo los viroides utilizando las enzimas necesarias del hospedero. El modelo propuesto, tiene en cuenta: 1) la replicación se hace sin DNA intermediario (como sí sucede en los retrovirus), ya que no se ha detectado moléculas de cDNA de viroides, en plantas infectadas. 2) La polimerasa que interviene en la replicación, puede ser la RNAPol II; esta es una enzima que transcribe los RNA mensajeros en las plantas, las evidencias de esto son dos: una consiste en que la RNAPol II puede utilizar como molde el RNA de los Viroides (aunque con baja eficiencia), la otra es que, cuando se utilizan inhibidores de dicha enzima, se inhibe también la replicación viroidal. 3). La replicación se realiza por el modelo de círculo rodante (RC), en el cual se deben producir oligómeros, (concatámeros), lineales, que luego deben cortarse en monómeros y circularizarse. El corte en la mayoría de los viroides se lleva a cabo por RNAasas del hospedero, con excepción de ASBVD y PLMVD, que poseen una secuencia en forma de cabeza de martillo, propia de las ribozimas, que son moléculas de RNA que sufren autoclivaje; por lo cual, estos dos viroides no requieren enzimas del hospedero para su clivaje después de la replicación. En cuanto a los otros viroides, se ha identificado en ellos que el dominio CCR

(conservado), es crucial para el corte (ver figura 2) y su mecanismo parece ser la formación de una tetra lupa en esta región. Existen fuertes evidencias para el modelo RC ya que se han aislado polímeros (dímeros, lineales y circulares de ssRNA viroidal), que serían los intermediarios de replicación esperados si el modelo es RC. 4) La circularización del monómero, y de algunos oligómeros, debe realizarse por una RNA ligasa codificada por el hospedero.

En cuanto a la replicación de los satRNA, la mayor diferencia con la de los viroides es que los primeros no requieren un virus ayudador, como sí ocurre con los segundos; lo cual estaría indicando que la polimerasa que utilizan es la del virus ayudador, que en caso de los virus RNA es una RNAPol RNA dependiente, llamada sintetasa y el mecanismo postulado es como en los viroides y en virusoides, es decir, se replican por círculo rodante (RC). Los satRNA como en ABVd y PLMVd, tienen secuencias que forma cabeza de martillo (para auto digestión), y la circularización, como en viroides, debe ser una RNA ligasa del huésped, o lo más probable una ligasa codificada por el virus ayudador.



**Figura 2:** Secuencias intermedias durante la replicación del viroide PSTVd en las cuales se evaluó la importancia de la región conservada (CCR), para la circularización del viroide, solamente la estructura A fue infectiva cuando se inocularon en tubérculos de papa, lo cual significa que la circularización es indispensable para la sobrevivencia de las partículas productos de la replicación

## **Evolución molecular.**

Se ha postulado que la información genética partió de RNA el cual pudo coexistir con proteínas y luego dicha información se guardó en DNA (el cual es más estable por la reducción del C2'), ¿Podrían los viroides y satRNAs ser moléculas fósiles en la evolución molecular, de las cuales por rearrreglos se originaron los genomas mayores como los virus RNA? O, por el contrario, ¿Estas pequeñas moléculas, con capacidad de replicación, se han derivado de otras mayores o de RNAs intermediarios en la función génica de eucariotes? A pesar de que las respuestas a estas preguntas han tenido mucho de especulación, con el desarrollo del análisis filogenético a nivel molecular, por medio de la comparación de secuencias, se ha logrado obtener evidencias que pueden arrojar alguna luz sobre las relaciones evolutivas de estas pequeñas moléculas infecciosas, con otras de las cuales se conoce un poco mejor sus funciones en el sistema vivo; a continuación discutiremos algunas de estas evidencias.

En 1971, cuando se introdujo el concepto de viroide, se pensó que estos tenían una estrecha relación filogenética con virus RNA, ya fuera que se hubiesen derivado de secuencias degeneradas de estos virus, o que fueran sus precursores ancestrales; pero con el análisis de las moléculas viroidales, se encontró que esta idea era poco probable, puesto que: 1. Las secuencias nucleotídicas de viroides no presentan homología con las de virus RNA; 2. Los viroides no tiene ORFs como los virus y 3. Su estructura terciaria es muy diferente. Esto hace que las distancias genéticas entre viroides y virus sean tan grandes, como para postular que tienen diferente origen, cuando se analizan los satRNA se llega a las mismas conclusiones. Teniendo en cuenta lo anterior, se ha buscado el origen de estas partículas en RNAs del hospedero y en otras entidades biológicas cuya historia evolutiva se conoce, específicamente Intrones, transposones y plásmidos, presentes en protozoos, utilizando para ello análisis de secuencias con el fin de detectar similitudes entre viroides, satRNA y estos elementos.

### **Similitudes con los intrones**

A partir del conocimiento molecular de PSTVd Roberts y Crick propusieron que tanto los intrones como los viroides eran moléculas que regulaban funciones celulares, más tarde se encontró que la región conservada presentaba gran homología con la región 5' del snRNA, de la unidad U1, que interviene en el mecanismo de maduración del mRNA (splicing), este snRNA se aparea con los extremos de los intrones, por lo cual se sugirió que los viroides serían intrones que adquirieron autonomía para su replicación. Otra evidencia para la relación filogenética de viroides con intrones, aparece cuando se descubren los intrones tipo I, que llevan a cabo auto procesamiento, la secuencia conservada en este

tipo de intrones, responsable de su autoclivaje, se encuentra presente en muchos viroides y satRNA, lo cual conecta estos elementos desde el punto de vista funcional y evolutivo; sin embargo, es de tener en cuenta algunas consideraciones en el sentido de que estas relaciones fueran fortuitas:

- Aunque los viroides del grupo PSTVd y satRNA pueden tomar la conformación semejante a intrones tipo I, desde el punto de vista teórico, termodinámicamente quedarían muy inestables, pues a diferencia de los intrones, las partículas infectivas son circulares.
- No se ha detectado autoclivaje en el viroide PSTVd (que tiene una secuencia semejante a los intrones, y el autoclivaje de ASBVd y PLMVd, lo mismo que en los satRNA es muy diferente en su mecanismo al que ocurre en los intrones tipo I.
- En los satRNA, la secuencia semejante a la de intrones tipo I, no es necesaria para clivaje pues cuando se ha removido, el autoclivaje del satélite no se afecta.

A pesar de lo anterior no se puede descartar que las secuencias comunes en viroides, satRNA e intrones tipo I, no sean una huella filogenética que este indicando un origen común para estas moléculas RNA.

### Origen de los viroides a partir de transposones

Los viroides del grupo PSTVd presentan similitudes en su secuencia, con los extremos de elementos de transposición; esto ha sugerido que los viroides y satélites pudieron haberse originado de dichos elementos, o de provirus retrovirales, por delección de la porción interior del elemento de DNA en el caso de los primeros, o la región central en el caso de los segundos. Existen además otras evidencias que relacionan, transposones, provirus retrovirales, y viroides, como son las secuencias invertidas repetidas imperfectas que se encuentran en la parte superior de la región central conservada en viroides (RCC); además, debemos tener en cuenta la riqueza, estadísticamente significativa, de secuencias CUUC o GAAG que se encuentran en esta región, así como en otras áreas de la estructura de los viroides, que son propias de los LTRs de provirus retrovirales y retrotransposones. Todo esto parece estar demostrando que quedan reminiscencias evolutivas de la región que se perdió, en estas moléculas, para originar los viroides. Las explicaciones para estas similitudes pueden ser: 1) Que aparecieron de manera fortuita, 2) Las secuencias comunes a los tres pudieron haber evolucionado de forma convergente (evolución concertada), para desempeñar una función común y 3) Viroides, provirus retrovirales y retrotransposones evolucionaron de una molécula ancestral común.



Si los viroides evolucionaron a partir de los transposones, deben haberlo hecho de manera diferente a los retrovirus, ya que para estos se postula que se originaron de transposones mediante incorporación de genes del hospedero, mientras que en los viroides, se tienen que haber perdido los elementos centrales de los transposones ancestrales.

## Relación de viroides con algunos plásmidos

Algunas cepas de los protozoos ciliados, como *Neurospora crasa* y *Neurospora intermedia*, tienen, en sus mitocondrias, plásmidos de dsDNA circulares, llamados Mauriciville y Varkud, de 3.6 y 3.7 kb, respectivamente. Estos plásmidos transcriben RNA lineales que aunque presentan diferencias esenciales con los Viroides, como la presencia de ORFs, tienen elementos conservados, propios de intrones tipo I que, al igual que en viroides, no son utilizados para autoclivaje. Esto es debido a que los RNA transcritos de los plásmidos sirven como molde para la replicación de los DNA y además los plásmidos DNA se integran al genoma mitocondrial de lo ciliados. Estaríamos en presencia de verdaderos elementos de transposición (transposones); por lo tanto, al asociarlos filogenéticamente con los viroides y satRNAs, estaríamos evidenciando la teoría de que los viroides y satRNA se han originado de transposones ancestrales y, aún más, podríamos entonces decir que como ellos (los transposones), estas partículas infecciosas son "intrones escapados".

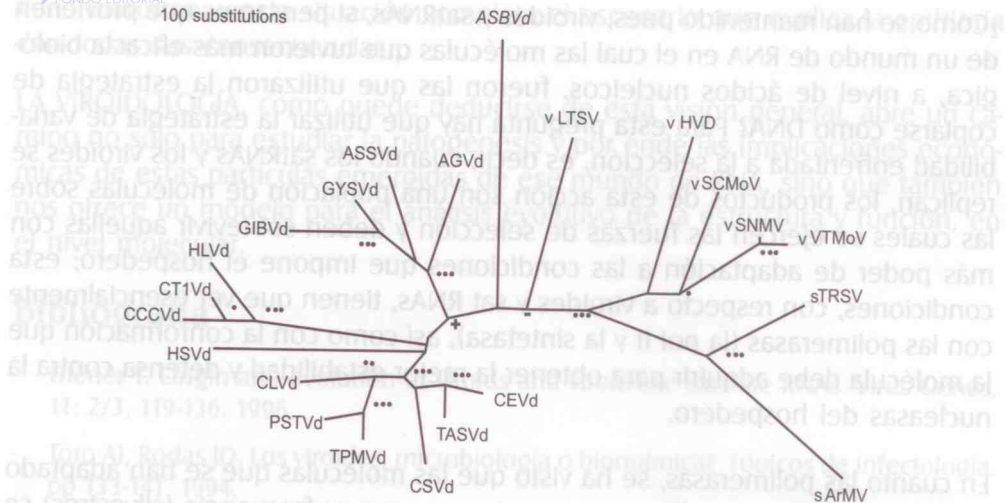
Otro plásmido mitocondrial que presenta semejanzas, aún mayores con viroides, es uno llamado Varkud pequeño (VSP) o satélite de Varkud, encontrado en *Neurospora intermedia*. El VSP consiste en una molécula de RNA, con forma lineal o circular, de 881 nucleótidos. Se ha encontrado que la forma lineal se genera por clivaje de la forma circular mediante un mecanismo semejante al que ocurre en la linearización de viroides; además igual que en viroides VSP, tiene elementos conservados en intrones tipo I que, como en ellos, no son funcionales para autoclivaje. Una semejanza más conspicua entre VSP y Viroides, es el hecho que el plásmido no presenta ORFs, es decir que, como los Viroides, carece de información genética convencional. Una característica interesante de VSP, es que parece haber dado un paso en su desarrollo evolutivo semejante al que dieron los satRNAs, para asegurar su sobrevivencia, pues para su replicación utiliza la transcriptasa reversa de Varkud y por esto se ha convertido en un satélite de dicho plásmido.

## A modo de conclusiones sobre la filogenia de los viroides y de los satRNAs

Con respecto a la evolución molecular de la información genética, la hipótesis de que "fue primero el RNA que el DNA", se convierte cada vez más en un

paradigma, sobre todo con el descubrimiento de la capacidad autocatalítica de algunas secuencias, llamadas RIBOZIMAS, encontradas en los intrones tipo I y II, que no necesitan actividad enzimática para su maduración (expresión); convirtiéndose entonces, estos RNAs, en moléculas únicas, con capacidad de ser al mismo tiempo genotipo y fenotipo, cosa que el DNA no puede hacer, pues requiere de proteínas para convertir el genotipo codificado en su secuencia, en el fenotipo correspondiente. La RIBOZIMA es una molécula precursora en la evolución de ácidos nucleicos, por tener la característica de expresarse sin requerir otra molécula que le sirva de intermediaria. Si retomamos las relaciones filogenéticas que se discutieron entre viroides satRNAs, transposones y algunos plásmidos, encontramos que la constante que los une es el rasgo en sus secuencias que alguna vez fueron o, aun son, RIBOZIMAS. Como se ha dicho anteriormente con respecto las características de estos elementos, la mayoría de satRNAs tienen elementos autocatalíticos, y en cuanto a viroides, los del grupo ASVd yPLMVd, conservan estos elementos funcionales; esto significa que ASVd yPLMVd, deben estar más cerca, evolutivamente, a satRNAs que el resto de viroides que, aunque conservan parte de esas secuencias propias de RIBOZIMAS, han mutado de tal forma que dejaron de ser funcionales. Una primera aproximación a la teoría de que Viroides y satRNAs han surgido a partir de moléculas ancestrales tipo RIBOZIMAS, por ende intrones primitivos, y que llevaría a considerarlos parientes de los transposones, es la comprobación del origen monofilético de satRNAs y viroides. Un método ampliamente empleado para hacer lo anterior, consiste en la comparación estadística de secuencias, con el fin de calcular las llamadas distancias genéticas, y con estos valores se construyen árboles filogenéticos, que permiten agrupar los más relacionados. El trabajo de Theodoro Diener nos muestra uno de los árboles (ver figura 3), construido por un método llamado de «unión de los vecinos» (del Inglés Neighbor Joining, NJ), utilizando comparación de secuencias de 4 satRNAs, 15 viroides y una región conservada en el virus de la hepatitis D (vHDV). Los resultados de este trabajo muestran: 1) Viroides, satRNAs y vHDV tienen un origen monofilético con un 80% de confiabilidad. 2) satRNAs y vHDV forman un grupo relacionado (lado derecho del árbol) y los viroides que no presentan autoclivaje se agrupan a la izquierda de este. 3) Los viroides del grupo ASBVd (que presenta autoclivaje), se localizan separando viroides y satRNAs, además la longitud de su rama sobresale, lo cual está indicando que pueden ser estructuras que tienen un estado evolutivo intermedio entre viroides y satRNAs.

Los resultados de este trabajo, son una evidencia experimental de la hipótesis que, en resumen, indica que un RNA ancestral (con características de ribozima, por ejemplo intrones tipo I) que por mutación dio origen a: 1) una forma divergente, el satRNAs (que no perdieron la actividad autocatalítica), 2) viroide (con actividad autocatalítica como el ASBVd) y, a partir de estos, 3) viroide (que perdieron la actividad autocatalítica).



**Figura 3:** Arbol filogenético construido con el método NJ comparando secuencias de viroides, satRNAs y un dominio del virus de la hepatitis D (vHVD); la rama que sobresale (ASBVd), es un viroide con secuencia autocatalítica activa y se sitúa entre los grupos formados por viroides (izq..) y los satRNA (der.).

El delineamiento general de esta hipótesis puede presentar vías intermedias que apenas alcanzamos a imaginar por el momento; por ejemplo los viroides pueden haberse originado a partir de satRNAs ancestrales, cuando estas moléculas existían de manera libre, es decir, no eran dependientes de sus virus ayudadores, y de esta manera los viroides con capacidad autocatalítica serían «los eslabones perdidos» entre viroides y satRNAs. De todas formas, el modelo de viroides y satRNAs, nos está mostrando la evolución a un nivel precelular; es decir, podemos observar, y aun cuantificar, la evolución darwiniana en acción; pues los viroides se replican por la RNAPol II del huésped y los satRNAs por la sintetasa del virus ayudador. Esto quiere decir, que la tasa de mutación (errores cometidos durante la replicación) es del orden de 1 por cada 1000 nucleótidos ya que las RNA polimerasas no tienen la actividad de corrección de prueba (exo 3'→5') como sí la tienen la mayoría de las DNA polimerasas DNA dependientes, que replican el genoma celular y de los virus DNA, las cuales permiten una tasa de mutación de 1 por cada 100 millones de nucleótidos. Este panorama nos muestra que estos RNAs con capacidad de replicarse, son genomas supremamente inestables; además, debemos tener en cuenta que el OH 2' de la ribosa, hace del RNA una molécula que fácilmente puede hacer transesterificación intra molecular entre un fosfato y el OH 2', lo que puede romper la cadena nucleotídica, o cambiar su conformación. Estaríamos frente a un genoma con una gran labilidad, para sobrevivir en un medio cambiante, al cual es necesario adaptarse.

¿Cómo se han mantenido pues, viroides y satRNAs, si pensamos que provienen de un mundo de RNA en el cual las moléculas que tuvieron más eficacia biológica, a nivel de ácidos nucleicos, fueron las que utilizaron la estrategia de copiarse como DNA? Para esta pregunta hay que utilizar la estrategia de variabilidad enfrentada a la selección, es decir, cuando los satRNAs y los viroides se replican, los productos de esta acción son una población de moléculas sobre las cuales se ejercen las fuerzas de selección y deben sobrevivir aquellas con más poder de adaptación a las condiciones que impone el hospedero; esta condiciones, con respecto a viroides y sat RNAs, tienen que ver esencialmente con las polimerasas (la pol II y la sintetasa), así como con la conformación que la molécula debe adquirir para obtener la mejor estabilidad y defensa contra la nucleasas del hospedero.

En cuanto las polimerasas, se ha visto que las moléculas que se han adaptado a ser reconocidas por ellas se encuentran en mayor frecuencia (silvestres) se replican de manera mas eficiente, que aquellas que consideramos mutadas, esto ha sido comprobado en el pequeño bacteriofago de E. Coli, llamado Q  $\beta$  en el cual se realizó un experimento, que consistió en someter a replicación moléculas con diferentes mutaciones y cuantificar las poblaciones resultantes; se pudo comprobar que las llamadas silvestres se replicaban con mayor velocidad, de tal manera, que si la selección "matara" moléculas silvestres y mutadas, que tengan en común un dominio de selección negativa, el número de silvestres sobrevivientes sería siempre mayor, por su eficacia replicativa.

Con respecto a la conformación de viroides y satRNAs, una de las propiedades que mayor estabilidad les confiere es el hecho de ser circulares, pues de esta forma adquieren una estructura en forma de doble hélice y esta hélice les otorga las siguientes propiedades: 1) Las reacciones de transesterificación, fosfato OH 2', son menos probables, pues la hélice es más rígida que la cadena simple. 2) Los ambientes celulares están plagados de enzimas que degradan RNA (RNAasas), cuya función es el recambio de mRNAs, pero su sustrato es esencialmente cadenas simples; por lo cual, la forma de doble hélice protege estas moléculas de la degradación y una mutación que impida su circularización sería fatal para la supervivencia (figura 2) y por ende, para el mantenimiento de la molécula en el sistema vivo.

Por último una mutación en satRNAs o en viroides, que no comprometa su replicación o su forma circular, por ejemplo en la región de patogenicidad (P), conferiría propiedades a estas partículas para que se expresen en diferentes hospederos y esto estaría explicando la aparición de epifitias como en el caso de PSTVd y TPMVd. En los germoplasmas silvestres deben existir poblaciones de viroides diversas, genéticamente, con la capacidad de explorar otros hospederos y eventualmente causar daño en plantas cultivadas, de susceptibili-

lidad uniforme, y esta situación completa el escenario que explica la epifitoria con todas sus consecuencias.

## Capítulo 18

LA VIROIDOLOGÍA, como puede deducirse de esta visión general, abre un camino no sólo para estudiar la patogénesis y por ende las implicaciones económicas de estas partículas emergidas de ese mundo de RNA, sino que también nos ofrece un modelo para el análisis evolutivo de la estructura y función, en el nivel molecular.

### Bibliografía

- Diener T. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. *Virus Genes*, 11: 2/3, 119-136. 1996.
- Toro AI, Rodas JD. Los viroides, microbiología o bioquímica? *Tópicos de infectología*. pp 133-141. 1994.
- Ian B. Dry, et al. A novel subviral agent associated with a geminivirus: The first report of a DNA satellite. *PNAS*. 94: 7088-7093. 1997.
- Diener, T. Understanding replication mechanisms in viroids and viroidlike RNAs. *Trends in microbiology*, 4 (3): 85-86. 1996.
- Baumstark T, et al. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *The EMBO J*. 16 (3): 599-610. 1997.

Desde 1712 se conoce en Europa una enfermedad en las ovejas, la cual se caracteriza por una ataxia crónica progresiva, que llega al punto de impedirles sostenerse en pie y es invariablemente fatal. Esta enfermedad es usualmente acompañada de prurito intenso que lleva a los animales a rascarse el cuerpo y las extremidades contra las cercas, hasta el extremo de provocarse laceraciones y de paso perder grandes cantidades de lana. El síntoma del intenso rascado fue entonces usado para darle nombre a la enfermedad: Scrapie del inglés "scrape", que significa raspar o rasguñar. Sólo hasta 1936 se tuvo la primera evidencia de que esta enfermedad era producida por un agente infeccioso, cuando Quélié y Chelle transmitieron Scrapie a ovejas sanas por inoculación intraocular (aunque luego también intracerebral, oral, subcutánea, intramuscular e intravenosa), a partir de extractos de cerebro de ovejas con la enfermedad.

En 1940 D.R. Wilson mostró que se trataba de un agente filtrable y que los tratamientos con calor y formaldehído no lo destruían completamente. En 1954 Sigurdsson clasificó la infección como una producida por virus lentos, basado en el hecho de que se trataba de una infección lentamente progresiva, con un período de incubación de varios meses o años y ausencia de respuesta inflamatoria a la destrucción celular. Posteriormente, por su tamaño pequeño (determinado por ultrafiltración), su resistencia extrema a inactivación por rayos X, irradiación ultravioleta y agentes químicos fuertes, se les empezó a llamar agentes no convencionales.