

Descendiendo la escala biológica hacia la frontera y el origen de la vida:

los viroides

Ricardo Flores Pedauyé

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas)

Campus Universidad Politécnica, Avenida de los Naranjos s/n, Valencia 46022

Introducción: los límites de la escala biológica

Los viroides son, en cierto modo, el peldaño inferior de la escala biológica. Esta breve presentación supongo que bastará para atraer la atención de cualquier interesado en las Ciencias Biológicas (y de probablemente de cualquier interesado “a secas”) pues los límites de todas las escalas despiertan una particular atracción: el interés por los dinosaurios, el extremo superior (al menos en cuanto a tamaño) de la historia de la vida en la Tierra, ilustra bien lo que quiero decir. Me apresuro a matizar (ya lo he hecho al incluir “en cierto modo” en la primera frase) que colocar a los viroides y los dinosaurios en ambos extremos de la escala biológica no es formalmente correcto, pues como más adelante se verá, los viroides carecen de metabolismo propio, a diferencia de los dinosaurios, que sin duda lo tuvieron. Pero viroides y dinosaurios comparten una propiedad característica de los seres vivos: la capacidad de generar copias de sí mismos en un entorno adecuado, o en otras palabras, estar dotados de replicación o multiplicación autónoma. Es este el marco en el que los viroides representarían la frontera inferior conocida de la vida (y es difícil que este límite descienda mucho más; volveré sobre este punto más adelante).

A lo largo de la segunda mitad del siglo XIX los trabajos de Koch y Pasteur asentaron las bases de la Microbiología como disciplina y en particular establecieron la naturaleza bacteriana de los agentes causales de una serie de enfermedades infecciosas. Sin embargo, hacia el final de su vida, Pasteur fue incapaz de aplicar con éxito la metodología que había desarrollado y que le había permitido cultivar e identificar numerosos agentes infecciosos, al caso del agente de la rabia. La razón de este fracaso es que estaba tratando con lo que hoy llamamos un virus, un patógeno de naturaleza radicalmente distinta a los descritos hasta entonces.

Para entender mejor el significado de los tamaños inferiores de la escala biológica conviene recordar que una célula procariota (es decir sin núcleo y por lo tanto de las más simples) como la de la bacteria *Escherichia coli* que se emplea como modelo en muchos estudios de biología básica, tiene aproximadamente un tamaño de $1 \times 2 \mu\text{m}$ y un genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) de 4×10^6 pares de bases. Una célula así es capaz de crecer en un medio mínimo compuesto de sales minerales y azúcar, lo que indica que su sencillez es sólo aparente ya que debe poseer toda la maquinaria necesaria para, a partir de este medio mínimo, obtener la energía y con ella sintetizar los componentes químicos que le permiten crecer y replicarse. Si pensamos ahora en una célula aún

más sencilla como la del *Mycoplasma genitalium*, que carece de pared y está separada del medio externo por sólo una membrana lipídica, su diámetro se reduce a 0.3 μm y su genoma (también de DNA) a unos 5×10^5 pares de bases. Esta simplificación estructural conlleva una mayor dependencia del medio de cultivo, que es mucho más complejo (en algunos casos el desconocimiento de este medio ha impedido el cultivo *in vitro* de ciertos micoplasmas). Descendamos otro peldaño ahora y entremos en el mundo de los virus: ya no estamos tratando con células puesto que los virus no lo son y porque su tamaño es notablemente inferior al de éstas. Por ejemplo un virus sencillo como el que causa la enfermedad del mosaico del tabaco está formado por partículas de 300x18 nm que contienen un ácido ribonucleico (RNA) de aproximadamente unas 6×10^3 bases recubierto por múltiples copias de una proteína que lo encapsida. Esta extremada simplificación estructural conduce paralelamente a un incremento de la complejidad del medio de cultivo, que en este caso está compuesto por las células del hospedante. Los virus son por lo tanto parásitos intracelulares estrictos, es decir que dependen para su multiplicación del metabolismo de las células que infectan. Estos tres ejemplos, (bacteria, micoplasma, y virus), ilustran otro punto: que la replicación de los entes biológicos requiere un cierto nivel de complejidad del sistema formado por ellos mismos y su entorno más inmediato, de forma que si la complejidad de uno de los dos componentes del sistema desciende, la del otro aumenta.

Virus y viroides

Los virus fueron descubiertos hacia finales del siglo XIX, siendo el primero de ellos el causante de la enfermedad del mosaico del tabaco. Así pues la Virología como la Genética, por poner otro ejemplo bien conocido, nació como disciplina ligada a mundo de las plantas, que a lo largo de la historia ha sido una fuente de nuevos e interesantísimos descubrimientos (digo esto porque la investigación biológica sufre, o al menos a mí me lo parece, de una excesiva focalización sobre todo lo relacionado con la Biomedicina).

El estudio detallado de los virus progresó a lo largo de la primera mitad del siglo XX (encontrándose que infectaban todo tipo de células: vegetales, animales, así como de hongos, bacterias e incluso micoplasmas), y condujo al paradigma de que eran los representantes más sencillos de la escala biológica. Fue una gran sorpresa que hace ahora aproximadamente 30-35 años aparecieran las primeras pruebas experimentales que indicaban la necesidad de modificar este paradigma debido a que existían unas entidades biológicas, los viroides, aún más sencillas. Ni que decir tiene que asentar este nuevo paradigma no fue tarea fácil ni de un día, sobre todo cuando los datos provenían de un área de conocimiento de “segunda división” (la Biología Vegetal, pido disculpas por la reincidencia). Pero como dijo Víctor Hugo: “Une invasion d’armées peut être résistée mais non pas une idée lorsque son temps est arrivé” (Una invasión de ejércitos puede ser resistida, pero no una idea a la que le ha llegado su tiempo).

Los viroides fueron descubiertos por T. O. Diener al tratar de identificar el agente causal de una de enfermedad que inicialmente se supuso inducida por un virus: la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata (*potato spindle tuber, PST*) (Fig. 1). Sin embargo, los experimentos dirigidos a concentrar las presuntas partículas virales (los viriones) condujeron a resultados inesperados: después de una prolongada ultracentrifugación la mayoría del “principio infeccioso” permanecía en el sobrenadante (mientras que viriones típicos empleados como control sedimentaban) y después de una centrifugación zonal en gradiente de sacarosa dicho principio migraba en regiones del gradiente que correspondían a entidades de tamaño considerablemente inferior a viriones convencionales. Además, observaciones similares se repitieron después de pretratar los extractos con un agente desproteinizante, lo que indicaba que el “principio infeccioso” era un ácido nucleico desnudo. Otros experimentos empleando la electroforesis en geles de poliacrilamida (una técnica para separar mezclas complejas de ácidos nucleicos), mostraron que el “principio infeccioso” era un ácido nucleico extremadamente pequeño, un RNA para ser más específicos (puesto que era resistente a la desoxirribonucleasa y sensible a la ribonucleasa), de estructura probablemente circular (ya que no se veía afectado por tratamientos con exonucleasas, una clase de enzimas que catalizan la degradación de los ácidos nucleicos a partir de sus extremos). Conviene ahora explicar lo que he venido denominando “principio infeccioso”. Un requerimiento clave en muchas ramas de la ciencia es disponer de un sistema experimental con el que pueda abordarse una cuestión. Cuanto más simple es el sistema y más rápidamente da respuestas, mucho mejor. Los experimentos clásicos de genética bacteriana son un buen ejemplo a este respecto: las placas se sembraban la noche anterior y los resultados se leían al día siguiente. Cuando aún se desconocía la naturaleza del agente causal de la enfermedad PST, la única manera de “seguirle la pista” era por su infectividad: se hacía un extracto de tejido infectado, se sometía a un tratamiento (por ejemplo incubarlo con una nucleasa), y el efecto se medía inoculando la preparación resultante en un bloque de plantas sanas para observar que había sucedido con “el principio infeccioso” (si su infectividad había disminuido o permanecía inalterada; en paralelo se efectuaba un experimento control en el que una alícuota del extracto original, sin tratamiento, se inoculaba en otro bloque de plantas sanas). Pronto se descubrió que los bioensayos se aceleraban notablemente si en vez de con patata (el huésped natural) se efectuaban con tomate (un huésped artificial), porque el tomate mostraba síntomas en un tiempo relativamente corto (12-14 días) y era además muy fácil de cultivar en invernadero (Fig. 1). Todos los experimentos descritos más arriba fueron realizados con esta metodología (bioensayos en tomate), que si bien sólo era semicuantitativa, permitió notables progresos: el “principio infeccioso” de la enfermedad PST era un pequeño RNA presumiblemente circular y dotado de replicación autónoma, al que Diener denominó viroide. Era posible que este RNA fuera un satélite, una clase de RNAs ya conocidos que son funcionalmente dependientes de un virus auxiliar del cual se dice en sentido figurado que son satélites, porque si bien el virus puede encontrarse sin el RNA satélite, este último se encuentra siempre acompañando al primero (un inciso: estos RNAs satélites son parásitos de sus virus auxiliares, y por lo tanto existe parasitismo por debajo del nivel celular). Sin embargo, los intentos de encontrar partículas virales en tejidos afectados por la enfermedad PST no dieron resultado y, además, el hipotético virus auxiliar debería transmitirse muy eficientemente por semilla (así se

propaga el tomate), lo que es inusual en virus vegetales, y debía estar también presente en otros huéspedes experimentales que ya se conocían.

Sigamos con la historia del descubrimiento de los viroides. En contra de lo que a primera vista pueda parecer, las comunidades científicas son intrínsecamente conservadoras y tienen buenas razones para serlo pues les ha costado mucho asentar el conjunto de paradigmas compartidos que forman su corpus doctrinal. Modificar significativamente este corpus exige argumentos de peso, de tanto más peso cuanto más importante sea la modificación. Era difícil convencer a la comunidad de virólogos de que existía algo más simple que los virus con experimentos basados exclusivamente en una tecnología “primitiva” como la de los bioensayos. Por entonces, en torno a 1970, las técnicas fisico-químicas ya habían irrumpido en los estudios biológicos como herramientas más “finas”. Una parte de los virólogos comenzaban a autodenominarse “moleculares” para dejar clara su afiliación, y a éstos sólo era posible convencerlos con sus propias armas. El argumento definitivo de la existencia de los viroides se obtuvo al identificar el “principio infeccioso” de la enfermedad PST con una entidad física: la infectividad de preparaciones de RNA separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida estaba estrictamente asociada con una banda (detectable por una propiedad física, su absorción en el ultravioleta), que estaba ausente en controles sanos. Además, cuando esta banda purificada se analizó mediante microscopía electrónica se pudo “visualizar directamente” un pequeño RNA con las propiedades de tamaño predichas (Fig. 2). A este RNA se le bautizó, ahora con toda propiedad, como el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (*potato spindle tuber viroid*, PSTVd).

Pronto se encontró un segundo viroide, el que causa la exocortis de los cítricos (*citrus exocortis viroid*, CEVd) y con el tiempo otros más que actualmente forman una lista de aproximadamente 30 miembros (ver más abajo). La mayoría causan enfermedades que afectan a cultivos de interés económico tanto herbáceos (patata, tomate, pepino, crisantemo, y lúpulo) como leñosos (cítricos, palmera, vid y diversos frutales como aguacate, manzano, ciruelo, melocotonero y peral). Sus efectos pueden ser devastadores, tal es el caso de un viroide que ha ocasionado la muerte de más de veinte millones de palmeras en Asia (principalmente en Filipinas), mientras que otros viroides se replican en sus huéspedes sin aparente daño para los mismos.

Los viroides alcanzan el status de entidades singulares de pleno derecho

No he comentado hasta ahora que significa pequeño al atribuir este calificativo a los viroides. Más arriba se ha dicho que el RNA del virus del mosaico del tabaco (*tobacco mosaic virus*, TMV) tiene aproximadamente unas 6000 bases. Las primeras estimaciones dieron para el RNA del PSTVd un tamaño de en torno a 200-300 bases (no muy distante del que luego se estableció por secuenciación), es decir unas 20-30 veces inferior al RNA del TMV. Una diferencia ciertamente apreciable ¿pero suficiente para establecer una nueva clase de entes biológicos?. Otro aspecto llamativo de los viroides es el carácter circular de su RNA, pues el RNA del TMV y de muchos otros ribovirus (virus de RNA) es lineal. Estas propiedades estructurales tan especiales, ¿tenían

implicaciones funcionales también singulares?. Esta era sin duda la siguiente pregunta de mayor interés. Todos los virus codifican en sus genomas al menos una, y habitualmente varias, proteínas propias. Volviendo al TMV, su RNA codifica la proteína que forma la cápsida que lo recubre, además de otras entre las que destaca una subunidad de la RNA polimerasa que cataliza su replicación, y una proteína llamada de movimiento que le permite al RNA viral translocarse de célula a célula. ¿Codifican los viroides alguna proteína?. Todos los experimentos han conducido a la misma conclusión: no. Aunque esta conclusión, como cualquier otra basada en resultados negativos hay que tomarla con reservas, los datos disponibles la sostienen sólidamente: 1) los intentos empleando sistemas *in vitro* e *in vivo* para examinar si los viroides tienen actividad de RNA mensajeros (mRNAs) han dado resultados negativos, 2) aunque en plantas infectadas por viroides se ha detectado la acumulación de ciertas proteínas, éstas son codificadas por el huésped y no por el RNA viroidal, y 3) el análisis de la estructura primaria de numerosos viroides (se empezó a disponer de estos datos a partir de 1978 en que se secuenció el PSTVd) ha mostrado que carecen de codones de iniciación típicos AUG y de marcos de lectura abierta de una cierta longitud que estén conservados entre miembros próximamente relacionados del grupo. Así pues, virus y viroides no sólo son estructuralmente distintos sino también funcionalmente. De forma simplificada podríamos decir que mientras los virus son esencialmente parásitos de la maquinaria de traducción de sus huéspedes, los viroides lo son de la de transcripción. Los viroides deben secuestrar RNA polimerasas celulares pre-existentes y reprogramarlas para que catalicen su replicación. Además, los viroides deben ejercer su efecto patogénico por interacción directa (no mediada por proteínas propias) de su RNA con factores del huésped.

“Nada en biología tiene sentido excepto a la luz de la evolución” (T: Dobzhanski). Apliquemos esta clásica norma al caso que nos ocupa. A la vista de unas propiedades estructurales y funcionales tan distintas entre virus y viroides, ¿cabe pensar que los viroides, en contra de lo que su nombre parece sugerir, tienen un origen evolutivo independiente de los virus?. Invito al lector que ha tenido la paciencia de llegar hasta aquí a que haga sus conjeturas. Si su paciencia no está aún colmada, encontrará la respuesta (o mejor, una respuesta, aunque con muy buena base), más adelante.

Estructura y clasificación de los viroides

Ya ha sido mencionado que la lista de viroides caracterizados comprende unos 30. Alguien ha dicho que “uno es una excepción y dos casi una generalidad”, lo que en otras palabras significa que el disponer de más de un miembro de un grupo no sólo permite consolidar dicho grupo (con un solo componente no hay tal) sino también identificar los rasgos conservados que lo caracterizan y crear subdivisiones en el mismo si procede. Sin más rodeos, establecer una clasificación, asunto éste que ciertamente ayuda a ordenar los conocimientos pero que resulta particularmente espinoso (y subjetivo) en Biología si consideramos que se trata de dividir un “continuum” en una serie de secciones discretas. Para los viroides (y los virus) se han adoptado recientemente, no sin cierta oposición, los criterios que se emplean para clasificar los organismos (con categorías taxonómicas

tales como familia, género y especie), y el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, a través de unos grupos de estudio formados por especialistas, propone y actualiza periódicamente la clasificación (y ocasionalmente la modifica).

El análisis comparado de la estructura primaria (la secuencia) y secundaria (cómo se repliega la cadena de RNA por medio de interacciones de Watson-Crick) ha revelado que la mayoría de los viroides adoptan una estructura secundaria en varilla o casi-varilla, con regiones de doble cadena separadas por bucles de simple cadena, en la que pueden distinguirse cinco dominios (Fig. 3A) y tres motivos conservados: 1) la región central conservada (*central conserved region, CCR*), formada por dos series de residuos opuestos en la rama inferior y superior, 2) la región terminal conservada (*terminal conserved region, TCR*), localizada en la rama superior del dominio terminal izquierdo, y 3) la horquilla terminal conservada (*terminal conserved hairpin, TCH*), que también se encuentra en del dominio terminal izquierdo. La secuencia de la CCR, y la presencia o ausencia de TCR y TCH (ambos motivos no co-existen simultáneamente) ha servido para agrupar la mayoría de los viroides (especies) en una primera familia, *Pospiviroidae*, y dentro de ella en cinco géneros (Fig. 4). Sin embargo, estos tres motivos conservados no existen en cuatro viroides, que presentan la extraordinaria propiedad de que sus cadenas de ambas polaridades son capaces de autocortarse por medio de ribozimas de cabeza de martillo (ver más adelante); además, dos de ellos adoptan estructuras secundarias claramente ramificadas (en vez de las de varilla) e incluso elementos de estructura terciaria (interacciones entre bucles terminales de alguna de las ramas) que ayudan a estabilizar el plegamiento. En la estructura terciaria de los RNAs las interacciones ya no son sólo de Watson-Crick sino de otras variadas clases que vienen siendo identificadas a lo largo de los últimos años (Fig. 3B). Dicha clasificación tiene un importante respaldo desde otra perspectiva. Los miembros de la familia *Pospiviroidae* se replican y acumulan en el núcleo mientras que los de la familia *Avsunviroidae* lo hacen en el cloroplasto (aunque esto sólo ha sido estudiado en algunos miembros de cada familia, todo indica que se trata de una pauta general). Esta correlación entre propiedades estructurales y funcionales (presencia de uno o más motivos conservados y replicación en uno u otro orgánulo) no es casual con toda probabilidad. Además, como ambos orgánulos tienen una composición muy diferente, la enzimología de la replicación de ambas familias viroidales deber ser muy distinta.

¿Cómo se multiplican los viroides en el interior de las células que parasitan?

El RNA viroidal infeccioso (al que por convenio se le asigna la polaridad positiva) al entrar en la célula huésped es capaz de emplear una RNA polimerasa ya existente, puesto que como se ha dicho más arriba los viroides no codifican proteínas propias, para producir cadenas de polaridad complementaria (o negativa). Esta RNA polimerasa, al ser circular el molde que transcribe, es capaz de “darle varias vueltas” al mismo generando un transcrito multimérico que contiene varias unidades en tándem. Este RNA negativo multimérico puede: 1) servir a su vez como molde para la síntesis de un RNA multimérico positivo que es luego procesado a longitud unitaria mediante una ribonucleasa (RNasa) y finalmente circularizado por una RNA ligasa dando lugar al producto de partida, o 2) ser procesado a

longitud unitaria y luego circularizado a monómeros negativos, que sirven entonces de molde para la síntesis de RNAs multiméricos positivos que siguen la ruta indicada en el apartado inmediatamente anterior. En cualquiera de las dos vías, denominadas asimétrica y simétrica respectivamente, de este mecanismo (de “círculo rodante” como muy expresivamente se le conoce), son requeridas tres actividades enzimáticas del tipo RNA polimerasa, RNasa y RNA ligasa. Pasémosles revista.

En principio había que presumir que las tres eran proteínas de origen celular pues, una vez más, los viroides carecen de actividad de mRNAs. A partir de resultados obtenidos fundamentalmente con inhibidores, se comprobó que la síntesis de las cadenas del PSTVd y otros viroides de la familia *Pospiviroidae* era bloqueada por las bajas concentraciones de α -amanitina (la toxina de un grupo de setas venenosas) que característicamente inhiben la RNA polimerasa II nuclear que cataliza la transcripción de los precursores de los mRNAs (las otras RNA polimerasas I y III catalizan la transcripción de los precursores de los RNA ribosómicos y de los pequeños RNAs, respectivamente). Experimentos similares empleando tagetitoxina sugieren que una RNA polimerasa cloroplástica específica (existen al menos dos en los cloroplastos) es la que interviene en la replicación del ASBVd. Ahora bien, estas RNA polimerasas deben transcribir cadenas de RNA viroidal y aquí nos encontramos con un primer (e interesantísimo) problema: las RNA polimerasas nucleares y cloroplásticas transcriben en condiciones normales moldes de DNA. No queda más remedio que aceptar que los viroides son capaces de “manipularlas” para que acepten un molde extraño de RNA. Cómo sucede esto es una de las cuestiones más intrigantes que quedan por resolver. En cuanto a la tercera actividad enzimática, la RNA ligasa (dejemos momentáneamente la segunda), se sabe poco acerca de ella porque el conocimiento general sobre estas enzimas es muy limitado (por ejemplo, no se ha clonado hasta ahora el gen de ninguna RNA ligasa de plantas). En todo caso parece que RNA ligasas de localización nuclear y cloroplástica deberían actuar en la replicación de los viroides de la familia *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, respectivamente. Volvamos ahora a la segunda etapa de ciclo replicativo, el corte de los intermediarios multiméricos a RNAs de longitud unitaria catalizado en principio por una RNasa (el lector perspicaz ya sospechará que tengo buenas razones para haberme saltado el orden “lógico”). Así es. En los viroides de la segunda familia la actividad RNasa no es una enzima convencional (es decir una proteína) sino una ribozima (una enzima compuesta de RNA), de la clase denominada cabeza de martillo, que reside en las propias cadenas viroidales. Este es un descubrimiento clave, con hondas implicaciones funcionales y evolutivas en lo que respecta a los viroides (como se verá más adelante), y con otras que los trascienden y que incluso afectan a cuestiones biotecnológicas (toda revolución conceptual suele conllevar otra de carácter tecnológico, un tema recurrente en la historia de la ciencia).

Para los que estudiamos Bioquímica hace ya algunos años, uno de los “dogmas” más firmes, piedra angular de esta disciplina, era: “Todas las enzimas son proteínas” (un dogma “canónico” requiere una declaración breve y contundente que lo defina). Fue una grandísima sorpresa que hacia 1980 se descubriera que algunas enzimas estaban compuestas de RNA, tan grande que a los descubridores de las ribozimas, T. Cech y S. Altman, les otorgaron el Premio Nobel de Química en

esa misma década. No es este el lugar para una exposición detallada de la estructura y mecanismo de acción de las ribozimas, pero sí conviene reseñar que de las varias clases de ellas que se conocen, las ribozimas de cabeza de martillo descubiertas en los viroides son las más sencillas y las que han sido sometidas a un estudio más pormenorizado desde todos los puntos de vista. La denominación de cabeza de martillo proviene de que su representación en dos dimensiones recuerda a la forma de esta herramienta (Figura 3), denominación que se sigue usando a pesar de que los estudios de cristalografía de rayos X muestran que la conformación tridimensional es bien distinta (nos gusta bautizar a las cosas nuevas por analogía con las conocidas, y una vez bautizadas, resulta difícil cambiarles el nombre).

Patogénesis

Ya se ha dicho más arriba que los viroides causan una serie de enfermedades en cultivos de importancia económica, y que éste fue el motivo que impulsó la investigación que condujo a su descubrimiento. La gama de huéspedes de los distintos viroides es muy variable: algunos infectan y causan enfermedades en un amplio espectro de huéspedes, mientras que otros se restringen a una especie o a unos pocos miembros de un género. Algunos viroides se transmiten a través de la semilla y el polen, y también hay un caso bien documentado de transmisión por áfidos. Sin embargo, la difusión de los viroides deriva fundamentalmente de prácticas agrícolas y en particular de la propagación vegetativa de material infectado y del empleo de herramientas de poda previamente contaminadas. Dentro de las plantas los viroides, como los virus, se mueven de célula a célula por los plasmodesmos y a larga distancia a través del floema. También a semejanza de lo que ocurre con los virus, se han descrito fenómenos de protección cruzada: cuando una planta infectada por una cepa suave de un viroide es posteriormente inoculada con una cepa agresiva del mismo viroide o de otro viroide similar, los síntomas típicos de éste último y su nivel de acumulación se atenúan por un cierto tiempo. Estos fenómenos, que recuerdan a los de inmunidad en vertebrados y que presentan un potencial aplicado muy notable, tienen sin embargo una base muy distinta cuyos detalles mecánicos distan mucho de ser comprendidos porque aún no entendemos cómo los viroides causan enfermedades. Se sabe que cambios en torno al 1% de la secuencia del RNA viroidal (3-4 nt) son suficientes para transformar los síntomas inducidos por miembros de ambas familias de suaves en agresivos. Estos cambios ocurren en ciertas regiones del RNA, que han venido a denominarse regiones moduladoras de la patogenicidad o determinantes de patogenicidad, y no conllevan diferencias en los niveles finales de acumulación, por lo que parece que deben afectar a la interacción del viroide con factores del huésped (presumiblemente proteínas, aunque no pueden descartarse otros RNAs), que al ser desviados de sus funciones fisiológicas normales conducen a alteraciones que en última instancia se manifiestan en la aparición de síntomas. La naturaleza de estos factores es prácticamente desconocida y con toda probabilidad constituirán un área de investigación futura.

Puesto que los virus infectan todo tipo de células, ¿ocurre lo mismo con los viroides?. Recorro de nuevo a la perspicacia del lector que a estas alturas habrá imaginado que si los viroides infectaran

células animales (¡y que decir si humanas!) ya lo habría mencionado (y los viroides serían mucho mejor conocidos del gran público). Por lo tanto la respuesta es que no, por el momento. Sin embargo, existe un RNA, el del virus delta de la hepatitis humana (*hepatitis delta virus*, HDV) que comparte ciertas propiedades con los viroides: es circular, adopta una estructura secundaria en forma de varilla, y se replica a través de un modelo de círculo rodante en el que el corte de los intermediarios oligoméricos es mediado por una clase especial de ribozimas. Sin embargo, a diferencia de los viroides, el HDV RNA es mayor (aproximadamente 1700 nt), codifica una proteína en su polaridad complementaria, y es funcionalmente dependiente de otro virus (el de la hepatitis B). Es de resaltar que cuando se descubrieron las propiedades tan especiales del HDV RNA, no se encontraron RNAs parecidos en el mundo animal, mientras que unos RNAs del mundo de la plantas presentaban claras similitudes. Los viroides fueron así tomados como referencia y por analogía con ellos se presumió que el HDV RNA se replicaría por un modelo de círculo rodante (lo que posteriormente se confirmó) y que, quizás, podría contener ribozimas (lo que también resultó una predicción acertada aunque las ribozimas del HDV sean muy distintos de las de los viroides). La moraleja es que aunque es obligado centrarse en un tema de investigación para conseguir progresar en el mismo, no conviene perder de vista las perspectivas generales. Las divisiones, en el caso que nos ocupa entre la virología animal y vegetal, son en buena medida arbitrarias y pueden esconder relaciones muy iluminadoras.

Una última reflexión en este mismo contexto. Durante algún tiempo se consideró la posibilidad que las encefalopatías que hoy se presume que están causadas por priones, proteínas anómalas que son capaces de propagarse (en cierto modo de “replicarse”), pudieran ser producidas por viroides (con lo que algún laboratorio de virología vegetal se llenó de hámsters, el huésped experimental de ciertos priones). La base de esta hipótesis residía en que por experimentos de fraccionamiento por tamaño y bioensayos se había inferido que el agente etiológico de estas enfermedades era muy pequeño y, además, no pudieron encontrarse virus asociados a las mismas. ¿En qué pensar en estas circunstancias?. Obviamente en los viroides, aunque la hipótesis no pudo luego verificarse. Los priones son agentes mucho más “heterodoxos” que los viroides (proteínas infecciosas, eso es lo que quiere decir su nombre). Por lo tanto, no hay un ácido nucleico como soporte de la información genética, o eso admiten la mayoría de los especialistas (refrendados por un Premio Nobel, S. Prusiner, por su trabajo en este campo), aunque un pequeño grupo de recalcitrantes se resiste a aceptar algo que mina otro de los “dogmas” de la Biología Molecular. En Ciencia, como en otras muchas cuestiones, ser ortodoxo o heterodoxo también es cuestión de mayorías o minorías (aunque eso sí, bastante “movedizas” como consecuencia de lo que muy apropiadamente se llaman revoluciones científicas).

Evolución

Los dos tipos de macromoléculas características de la vida tal y como hoy la conocemos, ácidos nucleicos y proteínas, son mutuamente dependientes. Los ácidos nucleicos, DNA y RNA, son capaces de almacenar la información genética y de transmitirla mediante un proceso de copia

(replicación) por el que una cadena sirve de molde para la síntesis de otra de polaridad complementaria y ésta última, a su vez, vuelve a servir de molde para la síntesis de cadenas idénticas a las iniciales. Este proceso necesita ser catalizado o acelerado por enzimas, proteínas que expresan las funciones codificadas en los ácidos nucleicos pero que no son capaces de almacenar y transmitir la información genética. Ahora bien, si la síntesis de ácidos nucleicos requiere proteínas y la síntesis de proteínas requiere a su vez ácidos nucleicos, ¿cuál de estas dos clases de moléculas apareció primero en la primitiva Tierra?. Hay dos formas de resolver esta paradoja (según S. Brenner, Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el 2002, “las paradojas señalan exactamente el punto donde se ocultan las claves cruciales”): aceptar que ácidos nucleicos y proteínas surgieron simultáneamente, lo que parece muy improbable, o que alguna de las dos fue capaz en algún momento de desempeñar ambas funciones. El descubrimiento de las ribozimas nos permite resolver esta paradoja evolutiva proponiendo que “en el principio fue el RNA” en razón de que esta molécula es capaz tanto de almacenar información como de expresarla en forma de una actividad catalítica. Hoy es una hipótesis ampliamente aceptada que en las primeras etapas de la evolución de la vida en nuestro Planeta existió un “mundo de RNA” anterior al actual basado en el DNA y las proteínas (los fósiles celulares más antiguos tienen una edad aproximada de 3500 millones de años). Con posterioridad el DNA suplantó al RNA como soporte de la información genética debido a que el primero es químicamente mucho más estable que el segundo (que tiene un grupo reactivo –OH extra por nucleótido), una propiedad importante que permite el almacenamiento de esta información sin un exceso de errores. Asimismo las proteínas, que al estar compuestas por veinte aminoácidos distintos son químicamente mucho más versátiles que el RNA, suplantaron como catalizadores a este último (químicamente mucho más monótono al estar constituido por sólo cuatro nucleótidos). Las ribozimas que aún operan en nuestro mundo actual (como las que catalizan la replicación de algunos viroides) serían “fósiles moleculares” del mundo precelular de RNA, y por lo tanto, aunque el papel actual del RNA es en cierto modo subsidiario entre el DNA y las proteínas, esto no implica que siempre fue así a lo largo de la evolución. No me resisto a comentar que, en otro de los grandes giros que hacen tan atractiva a la Ciencia, se ha descubierto hace unos pocos años que el componente “noble” (catalítico) del ribosoma, el orgánulo celular donde ocurre la formación del enlace peptídico (la reacción probablemente más importante de la Bioquímica) es el RNA, mientras que las proteínas vienen a actuar de mero armazón (justo al revés de lo que se creía anteriormente). Como ha sido resumido de forma admirable: “the ribosome is a ribozyme” (el ribosoma es una ribozima).

Volvamos a nuestros modestos protagonistas que tan lejos nos han llevado. Corolario de todo lo anterior es que los viroides muy probablemente aparecieron en este mundo precelular de RNA y que por lo tanto tienen un origen antiquísimo e independiente del de los virus. Así pues, resumiendo, los viroides son estructural, funcional y evolutivamente distintos de los virus. Estos pequeños RNAs poseen las señales para infectar un huésped, manipular su metabolismo en beneficio propio y, como consecuencia, inducir ocasionalmente enfermedades (y algunos, además, contienen ribozimas), todo ello condensado en un tamaño de tan solo 250-400 bases. Por eso decía al comienzo de este artículo que es difícil pensar que este tamaño pueda encogerse significativamente.

El estudio de los viroides ilustra una vez más cómo fluye la ciencia. Partiendo de una cuestión específica, y de una importancia aparentemente limitada (la caracterización del agente causal de una enfermedad de plantas), se ha llegado a conclusiones de carácter general: la identificación una nueva clase de RNAs con propiedades insólitas que los hace candidatos a ser unos de los primeros “pobladores” (dicho sea con todas las reservas) de nuestro Planeta. También esto instruye sobre cuán inútil es el énfasis que se pone en dirigir la investigación científica a resolver, sin rodeos diletantes, cuestiones de interés aplicado. Del estudio de los viroides se ha derivado el descubrimiento de las ribozimas de cabeza de martillo, las más simples conocidas, con importantes aplicaciones biotecnológicas imposibles de predecir antes de que se conocieran. El auténtico motor de la ciencia, del arte, y de cualquier actividad creativa es la curiosidad, cualidad ésta que hizo descender a nuestros antepasados de los árboles para explorar la “terra incognita”.

Bibliografía

Diener, T. O. (2001). “The viroid: biological oddity or evolutionary fossil?” *Advances in Virus Research* 57, 137-184.

Flores, R., Daròs, J.A. y Hernández, C. (2000). The *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in Virus Research* 55: 271-323.

Hadidi, A., Flores, R. Randles, J. W. y Semancik, J.S. (eds.) (2003). *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

Pies de las figuras

Fig. 1. Síntomas inducidos por el PSTVd en tubérculos de su huésped natural patata (arriba izquierda) y en plantas de su huésped experimental tomate (abajo izquierda). En ambos casos los controles sanos aparecen a la derecha (Cortesía de T.O. Diener).

Fig. 2. Micrografía electrónica de una mezcla de preparaciones purificadas del RNA del PSTVd y del DNA del colifago T7. La diferencia entre los tamaños de ambos genomas y la estructura en varilla del RNA viroidal se observan claramente. (Micrografía original de J.M. Sogo y Th. Koller. Reproducida con permiso de “Viroids and Viroid Diseases”, T. O. Diener, John Wiley and Sons, Inc., 1979).

Fig. 3. Modelos estructurales para los viroides. **(A)** Estructura en forma de varilla propuesta para los miembros de la familia *Pospiviroidae* en la que se indica la situación aproximada de cinco dominios estructurales C (central), P (patogénico), V (variable), and T_L and T_R (terminal izquierdo y derecho, respectivamente). Dentro del dominio C se encuentra la región central conservada (CCR) (la que aquí se presenta es la del género *Pospiviroid*), y dentro del dominio T_L la región terminal conservada (TCR) y la horquilla terminal conservada (TCH) que, alternativamente, se presentan en los miembros de esta familia. Las flechas denotan secuencias flanqueantes que junto con las de la rama superior de la CCR

forman una repetición invertida imperfecta. **(B)** Arriba, estructura casi en varilla propuesta para los viroides del manchado solar del aguacate (*avocado sunblotch viroid*, ASBVd) y del mosaico latente del melocotonero (*peach latent mosaic viroid*, PLMVd), ambos de la familia *Avsunviroidae*, con los nucleótidos conservados en todas las estructuras de cabeza de martillo dentro de cajas con fondo negro y blanco para las polaridades (+) y (-) respectivamente. Las líneas discontinuas en PLMVd indican un pseudonudo, un elemento de estructura terciaria. Abajo, estructura de cabeza de martillo consenso con los nucleótidos conservados en todas las estructuras de cabeza de martillo dentro de cajas con fondo negro y con la flecha señalando en sitio de autocorte. H indica A, C o U, y N cualquier nucleótido. Las líneas continuas y discontinuas denotan pares de bases canónicos (Watson-Crick) y no canónicos, respectivamente. El bucle central está flanqueado por tres hélices I, II y III.

Fig. 4. Clasificación de los viroides. Se ha mantenido la terminología inglesa en el nombre de los viroides, de la que derivan las siglas. En el texto principal se ha traducido el nombre de algunos de ellos.