



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves

Celia E. Coto

Profesora Titular Consulta Departamento de Química Biológica.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria.
Pabellón 2. 4to Piso. C1428EGA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

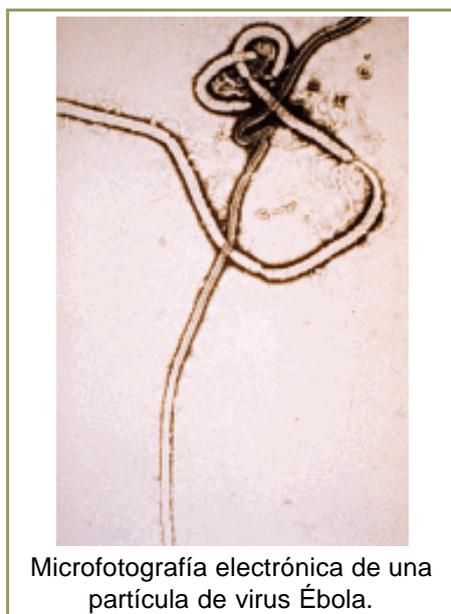
virocoto@qb.fcen.uba.ar

Recibido el 01/04/07. Aceptado el 11/04/07.

Introducción

En la permanente interacción de la especie humana con los microorganismos se pueden anotar triunfos de uno u otro bando. Dicho en forma ligera, principalmente las bacterias y los virus fueron modelando el sistema inmune del hombre, en tanto éste con el uso y abuso de drogas antimicrobianas los ha forzado a modificar sus genomas. De este modo, y debido a la gran plasticidad de los genomas microbianos, las poblaciones naturales u hospitalarias se han convertido en resistentes a las drogas que antes los mataba. Existen numerosas ópticas por las que se puede ver o analizar esta batalla sin fin, ya que muchas acciones humanas, sobre todo los resultados de algunas guerras ocurrieron por la colaboración no solicitada de los microorganismos. Como todos sabemos, los dirigentes actuales especulan con el uso de las armas biológicas, por ahora como excusa o amenaza, aunque invierten ingentes cantidades de dinero en el estudio de los agentes bioterroristas como el virus Ébola. Para el control de las enfermedades infecciosas se dispone de una extensa variedad de antibióticos, antivirales, antifúngicos y un arsenal menor de drogas antiparasitarias. Dada la resistencia de los microorganismos a los compuestos en uso clínico son innumerables los trabajos de investigación y desarrollo dedicados a la búsqueda de nuevos fármacos. Se dispone también de vacunas específicas contra un gran número de virosis y enfermedades bacterianas, aunque no para todas, que se aplican regularmente en la niñez. Por último, la mejor defensa individual es la inmunidad que se logra naturalmente después de sufrir una forma leve de una enfermedad infecciosa. A pesar de la existencia de estas formas de defensa, los científicos siguen buscando nuevas estrategias para aplicar en las enfermedades graves con una mortalidad superior al 60%, para las que no se disponen de vacunas o drogas específicas. Este es el caso, por ejemplo, del shock séptico, el ántrax producido por el *Bacillus anthracis*, la peste

originada por *Yersinia pestis* y la fiebre hemorrágica por virus Ébola. El shock séptico, sepsis o respuesta sistémica (SRIS), es una enfermedad grave causada por una abrumadora infección del torrente sanguíneo por parte de bacterias productoras de toxinas. El virus Ébola pertenece a una familia de virus que causa enfermedad severa en el hombre y en primates. La familia se denomina Filoviridae porque se trata de virus de forma peculiar, son largos filamentos como hilos (ver microfotografía electrónica). Fue aislado de primates africanos y en la misma familia se encuentra el virus de Marburg que causó un brote de fiebre hemorrágica en cuidadores de monos en Alemania. El virus Ébola célebre por haber sido el motivo de una novela aterrizante, que luego fuera llevada al cine, es considerado un agente bioterrorista grado A. Los agentes considerados bajo esta denominación se dividen en A, B y C, siendo los A los más peligrosos porque son considerados como de gran riesgo para la salud de una población. Las propiedades que presenta un agente de estas características es que se diseminan fácilmente de persona a persona, preferentemente por vía aerógena, producen mortalidad alta, causan pánico generalizado y requieren, por parte de las autoridades de la salud, atención especial ya que no existen medidas efectivas para combatirlos.



Microfotografía electrónica de una partícula de virus Ébola.

Características del shock séptico.

Tanto en pacientes con este síndrome séptico como en modelos animales con sepsis, en la fase final de la enfermedad se produce una destrucción masiva de linfocitos, células dendríticas y células epiteliales intestinales mediante la desregulación de un proceso fisiológico de muerte programada conocido con el nombre de apoptosis. Hay publicaciones que indican que este mismo fenómeno ocurre en la infección por virus Ébola, en los casos de peste y en el ántrax. Dado que la apoptosis es un proceso fisiológico en el que ocurren una serie bastante conocida de procesos bioquímicos, los investigadores han pensado que el bloqueo de algún paso

fundamental de la apoptosis mediante un fármaco atenuaría la severidad de las infecciones mencionadas antes. Efectivamente, trabajos realizados en modelos animales muestran que se producen mejoras notables en el curso de estas infecciones aunque todavía no está todo resuelto.

¿Qué es la apoptosis?

Como todo ser vivo la célula tiene un tiempo para vivir y otro para morir, cuando muere puede ser el resultado de una acción directa de un agente deletéreo o de que la célula se suicida. La muerte por un daño tóxico o mecánico se denomina necrosis y presenta una serie de características. Las organelas, como por ejemplo, las mitocondrias se hinchan porque su membrana plasmática pierde el control del pasaje de los iones y del agua y de este modo se disgrega, los contenidos de la célula se escapan al medio extracelular y se produce una inflamación de los tejidos vecinos. En la apoptosis, en cambio, la célula sufre una serie de transformaciones sucesivas, en forma de pasos muy regulados, por eso se conoce también con el nombre de muerte celular programada. Cuando la célula es inducida a cometer suicidio se encoge, aparecen burbujas en su superficie, la cromatina del núcleo se degrada, se rompen las mitocondrias que liberan citocromo C, quedando pequeños fragmentos membranosos, y la fosfatidilserina que normalmente está dentro de la membrana celular queda expuesta en su superficie. Cuando esto ocurre aparecen receptores a los que se unen los fagocitos que pueden ser macrófagos o células dendríticas que rodean y digieren los restos celulares, a la vez que secretan citoquinas conocidas como IL-10 y TGF- β . para evitar la respuesta inflamatoria. La apoptosis es para la célula un proceso tan propio de ella como la mitosis. Si bien la apoptosis es un proceso fisiológico cuyas funciones puntuales no describiremos aquí, cuando el proceso, en lugar de ser positivo, se desborda puede resultar deletéreo. En la figura 1 mostraremos un esquema de cómo ocurre la apoptosis según el conocimiento actual. Se podrán observar los factores proteicos participantes La inclusión de esta figura no tiene por objeto analizar cada componente sino facilitar la comprensión de cuáles son los puntos clave donde pueden actuar los fármacos para detener el proceso.

Mecanismo de la apoptosis

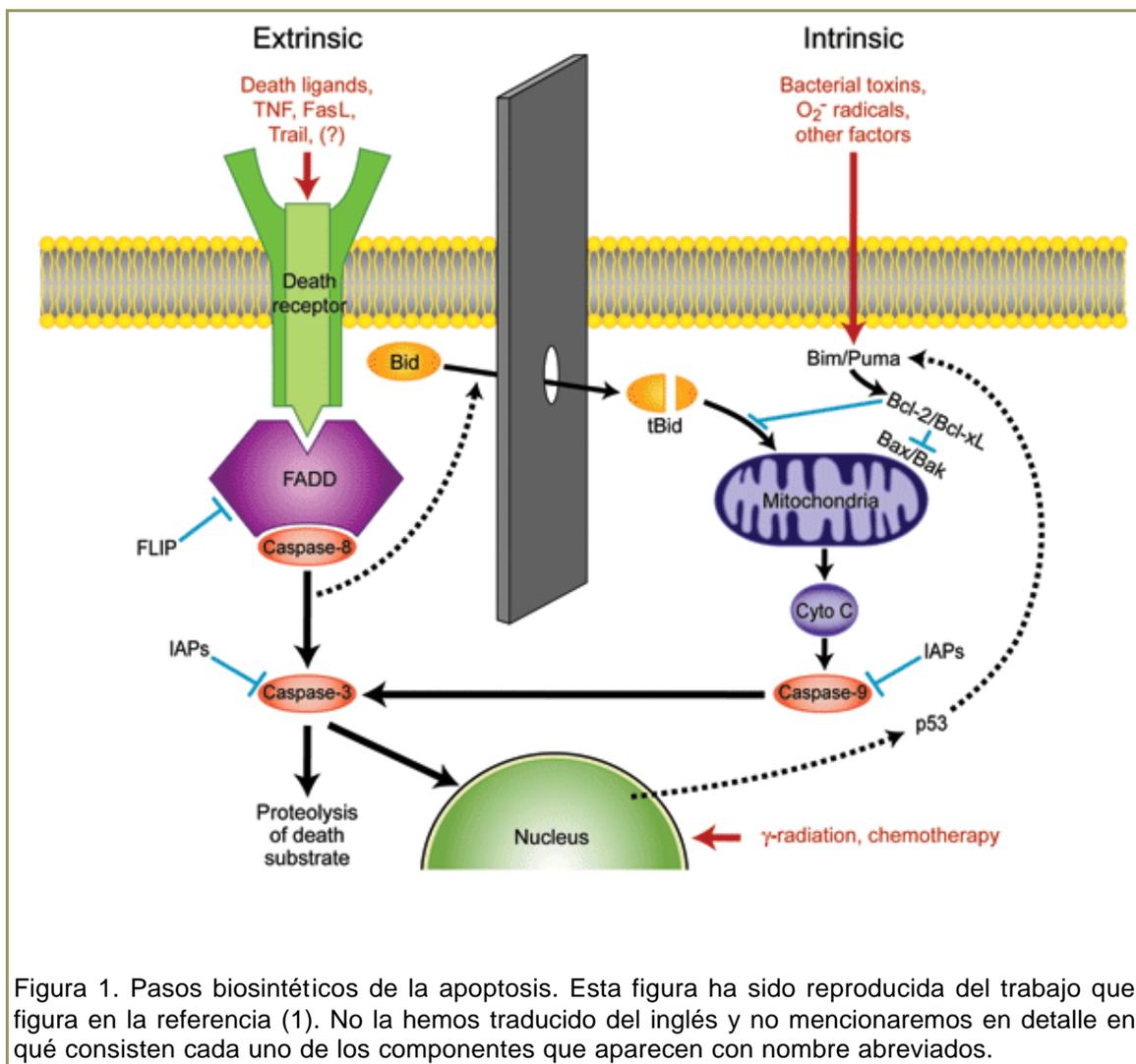
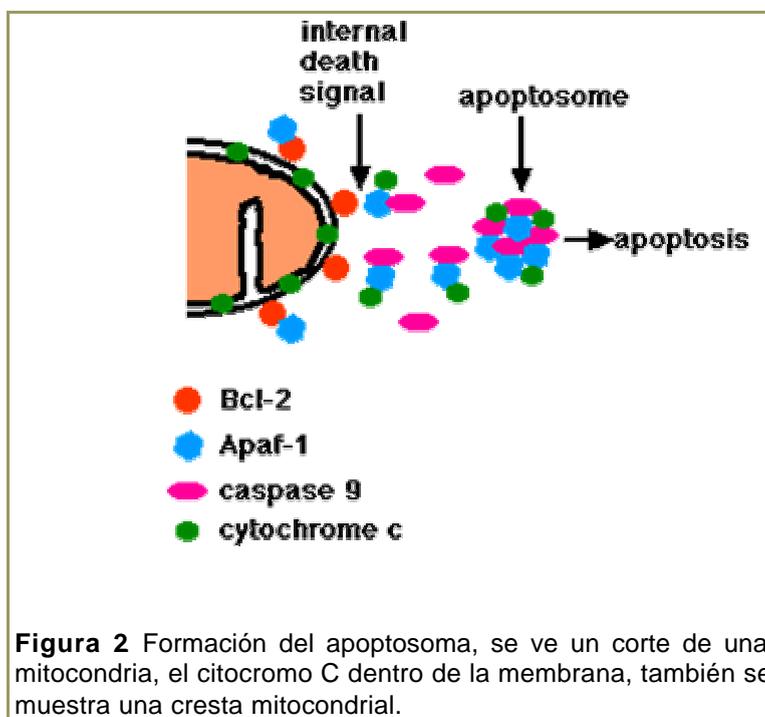


Figura 1. Pasos biosintéticos de la apoptosis. Esta figura ha sido reproducida del trabajo que figura en la referencia (1). No la hemos traducido del inglés y no mencionaremos en detalle en qué consisten cada uno de los componentes que aparecen con nombre abreviado.

La apoptosis puede ser desencadenada por señales internas de las células, en este caso tiene lugar por el denominado camino intrínseco o camino de la mitocondria, los detalles se aprecian en el lado derecho del esquema. O bien puede tener lugar mediante el otro mecanismo apoptótico: el extrínseco que es disparado por señales externas a la célula y es conocido también como el camino de la muerte vía receptor. Estos receptores pertenecen a una familia cuyos miembros están presentes en células distintas. Cuando se produce la unión de estos receptores a proteínas ligando específicas se desencadena una señal de muerte. Los reguladores de la apoptosis pueden dividirse en forma amplia en tres categorías: inductores, efectores y ejecutores. Los inductores, señales externas o agentes genotóxicos como la quimioterapia, la radiación y otros gatillan a los efectores que son cascadas intracelulares que transmiten la señal de muerte (buscan a quien debe cumplir la orden). Los efectores son las cascadas intracelulares al final de la vía que causan la apoptosis (ejecutan la orden) (2).

Camino intrínseco:

Los factores que desencadenan la muerte por este camino pueden ser la presencia de toxinas bacterianas, el efecto de radicales libres de oxígeno o bien la acción de agentes como rayos gamma, o quimioterapia sobre el núcleo. Estos factores activan a dos proteínas conocidas como Bim y Puma que son dos factores pro-apoptóticos que a su vez activan a Bcl-2(B cell leukemia 2), proteína presente en la membrana de la mitocondria, la que a su vez interacciona con una proteína cercana llamada Bax que produce agujeros en la membrana de la organela. Esta acción permite la salida del citocromo C del interior de la mitocondria al citosol donde se une a la proteína Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa apoptótica) y a la procaspasa 9. La unión se realiza con la intervención de ATP, así se forman los llamados apoptosomas (se muestran en la figura 2). Así se activa la procaspasa formándose la caspasa-9. Recordemos que las caspasas, son una familia de proteasas, enzimas que degradan cadenas polipeptídicas.



Volviendo a la figura 1, la caspasa-9 se corta en fragmentos y esto da lugar a una serie de eventos en cascada que termina con la degradación de los componentes celulares y nucleares (inducción de endonucleasas) como muestra la flecha que parte de la caspasa-3, enzima ejecutora a la que apuntan ambos mecanismos, el intrínseco y extrínseco. En el esquema se muestran también los factores llamados IAPs que son inhibidores de la apoptosis y que funcionan en ciertas condiciones pegándose a los apoptosomas. En cuanto a p53 que se libera en caso de daño al núcleo y es un potente inductor de la apoptosis por eso cambios genéticos en el gen de p53 están relacionados con las células cancerosas.

Camino extrínseco

La vía extrínseca involucra la activación de la cascada apoptótica a través de receptores de la membrana celular en respuesta a señales (ligandos) extracelulares. Inductores de esta vía son los miembros de la familia TNF (TNF, Fas L, Trail) ligandos de los receptores de muerte celular. Una vez activado el receptor se inicia la fase ejecutora intracelular. Durante esa fase la señal apoptótica puede ser inhibida y la célula logra sobrevivir. Pero una vez pasado cierto punto, no hay retorno y la célula va a morir. Como vemos en la figura 1, FADD está asociado al receptor de muerte y a su vez está en contacto con la caspasa 8, cuando se desenmascara la unión la caspasa 8 al igual que la nueve desencadena una serie en cascada que activa a la caspasa-3 que es la ejecutora. Hay factores como el FLIP que tienen la capacidad de evitar la apoptosis, la conexión entre ambas vías se da por medio de la ruptura de la proteína Bid. La caspasa 8 corta a la proteína y se crea la forma truncada Bid (tBid) que según se ve en el esquema actúa sobre la mitocondria. Sin pretender analizar la función y características de cada factor participante de la muerte celular programada, resalta la complejidad del proceso ya que se trata de un verdadero mecanismo controlado que si se sale de control puede producir grandes daños. No sería extraño, que mientras estamos escribiendo este trabajo, ya se hubiera descubierto algún otro factor proteico.

Factores que previenen la apoptosis de los linfocitos en modelos de sepsis murina.

De acuerdo con la bibliografía se han ensayado diferentes abordajes para frenar el ciclo de la apoptosis, en el cuadro siguiente extraído de la referencia (1) se pueden encontrar algunos fármacos efectivos.

Cuadro 1. Abordajes terapéuticos para evitar la muerte masiva de linfocitos en modelos de sepsis murina.

Estrategia	Factor utilizado	referencias
Prevención del disparo de la vía extrínseca	Bloqueo del ligando Fas utilizando una proteína Fas de fusión.	3
Ídem	Prevención de la expresión Fas por el uso de siRNA	4*
Prevención de la iniciación	Anticuerpos agonistas anti-CD40	5**
Ídem	Uso de péptidos agonistas de Bcl-2	6
Prevención del inicio de la vía intrínseca	Inhibidores de retroproteasas virales	7
Prevención de la fase de ejecución	siRNA anti-caspasa 8	8
Ídem	Tratamiento con inhibidores de caspasas	9

* se puede consultar de qué se trata el RNA de interferencia en la cita 10. ** CD40 es un receptor de muchas células involucradas en la respuesta inmune que tiene actividad antiapoptótica, la estrategia de los autores de este trabajo fue desarrollar un anticuerpo anti – CD40 que actúa como agonista (aumenta la actividad) induciendo la actividad antiapoptótica a mayores niveles.

Conclusiones

Inhibir algún paso del camino de la apoptosis de los linfocitos es otra estrategia que dispone el profesional de la salud para combatir las enfermedades infecciosas severas. Si bien en los modelos murinos esta estrategia ha dado resultados positivos hay que tener en cuenta que la apoptosis es un proceso celular muy regulado cuya manipulación puede tener alcances nocivos no siempre previsible.

Referencias

1. Janie Padrino, Richard S. Hotchkiss and Mike Bray. 2007. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerging Infectious Diseases* vol 13. 191-198.
2. Mauricio Cuello F., Sumie Kato C., Anil Sadarangani K., Claudia Saez S., Roger Gejman E., Gareth Owen, Stanley Lipkowitz. 2006 Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esferoidales ováricas en la apoptosis inducida por el ligando Trail en cánceres ginecológicos. *Boletín Escuela de Medicina U.C.Pontificia Universidad, Católica de Chile*. Vol. 31 No1, 5-15.
3. Chung CS, Yang S, Song GY, Lomas J, Wang P, Simms HH, Chaudry IH, Ayala A. 2001. Inhibition of Fas signaling prevents hepatic injury and improves organ blood flow during sepsis. *Surgery* 130 (2). 339-45
4. Doreen E. Wesche-Soldato, Chun-Shiang Chung, Joanne Lomas-Neira, Lesley A. Doughty, Stephen H. Gregory, and Alfred Ayala. 2005. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood*, Vol. 106, No. 7, pp. 2295-2301.
5. Steven J. Schwulst, Mitchell H. Grayson, Peter J. DiPasco, Christopher G. Davis, Tejal S. Brahmabhatt, Thomas A. Ferguson and Richard S. Hotchkiss. 2006. Agonistic Monoclonal Antibody Against CD40 Receptor Decreases Lymphocyte Apoptosis and Improves Survival in Sepsis. *The Journal of Immunology*, 177: 557-565.
6. Richard S. Hotchkiss, Kevin W. McConnell, Kristin Bullok, Christopher G. Davis, Katherine C. Chang, Steven J. Schwulst, Jeffrey C. Dunne, Gunnar P. H. Dietz, Mathias Bähr, Jonathan E. McDunn, Irene E. Karl, Tracey H. Wagner, J. Perren Cobb, Craig M. Coopersmith and David Piwnica-Worms. 2006. TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL Peptides Protect against Sepsis-Induced Lymphocyte Apoptosis In Vivo. *The Journal of Immunology* 176: 5471-5477.
7. Joel G.R. Weaver, Agathe Tarze, Tia C. Moffat, Morgane LeBras, Aurelien Deniaud, Catherine Brenner, Gary D. Bren, Mario Y. Morin, Barbara N. Phenix, Li Dong, Susan X. Jiang, Valerie L. Sim, Bogdan Zurakowski, Jessica Lallier, Heather Hardin, Peter Wettstein, Rolf P.G. van Heeswijk, Andre Douen, Romano T. Kroemer, Sheng T. Hou, Steffany A.L. Bennett, David H. Lynch, Guido Kroemer and Andrew D. Badley.. 2005. Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *J. Clin. Invest.* 115:1828-1838.
8. Doreen E. Wesche-Soldato, Chun-Shiang Chung, Joanne Lomas-Neira, Lesley A. Doughty, Stephen H. Gregory, and Alfred Ayala. 2005. In vivo delivery of caspase-8 or Fas siRNA improves the survival of septic mice. *Blood*, Vol. 106, No. 7, pp. 2295-2301.

9. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE. 2000. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol.* 1(6):496-501

10. Calvo, JC. 2003. Una nueva visión del ARN: los ARN de interferencia ¿Un nuevo genoma?. *QuímicaViva* vol 2 nº 3.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 1, año 6, Mayo 2007

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar