

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>

INVESTIGACION BASICA Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Drs. GISELLA BORZONE TASSARA*, SERGIO GONZALEZ BOMBARDIERE**

En los últimos años se han experimentado importantes avances en el conocimiento de la patogenia de las enfermedades respiratorias crónicas, gracias a un enfoque a nivel celular de los problemas que éstas representan. Ejemplos de ello son el rápido desarrollo de los estudios en fibrosis quística y el enfoque desde un punto de vista bioquímico de los mecanismos de disfunción diafragmática asociada a las enfermedades pulmonares crónicas.

TERAPIA GENETICA EN ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Si bien la fibrosis quística es de baja frecuencia en Chile, los rápidos avances en el conocimiento de sus aspectos moleculares le confieren gran interés a este tema. Sus complicaciones pulmonares son responsables de más del 90% de las muertes por la enfermedad (1), debido a que estos pacientes tienen obstrucción crónica por mucus viscoso y tapones mucopurulentos en bronquios y bronquiolos, infecciones bacterianas recidivantes, bronquiectasias e insuficiencia respiratoria. Se ha demostrado que la anomalía básica está en el epitelio respiratorio y consiste en una impermeabilidad al Cl⁻ (2,3). La proteína relacionada con el canal apical de Cl⁻, denominada regulador del transporte transmembrana de fibrosis quística (CFTR) funciona en forma deficiente debido a mutaciones en el gen que la codifica y que se localiza en el cromosoma 7 (7q31). La mutación F508 es la más frecuente y está presente en el 70% de los casos (4).

En los últimos años, luego de los notables avances experimentados en el conocimiento de los aspectos genéticos de la patogenia de la fibrosis quística, se han aunado esfuerzos para desarrollar una terapia genética en esta enfermedad. El objetivo de este tratamiento es introducir un gen normal capaz de reemplazar al gen defectuoso que participa en la producción de una proteína deficitaria o anormal. Tanto en fibrosis quística como en el déficit de alfa-1-antitripsina se han utiliza-

do experimentalmente como vectores los retrovirus y los adenovirus (5-10).

Dos problemas han surgido de los modelos experimentales *in vivo* realizados hasta hoy: la elevada frecuencia de variación genética y la integración al azar del provirus en el cromosoma del huésped (6). El adenovirus es un vector que tiene algunas ventajas evidentes: las células del epitelio respiratorio son un blanco natural, no se requiere de proliferación celular para la expresión de proteínas adenovirales y genes recombinantes asociados, es rara la recombinación con los genes del huésped, no hay asociación conocida con neoplasias humanas, el virus vivo se ha utilizado con éxito como vacuna humana y puede acomodar un cADN exógeno largo (hasta 7,5 kilobases).

Los estudios *in vitro* han mostrado que la transferencia de cADN de CFTR a líneas de células epiteliales derivadas de individuos con fibrosis quística permiten a estas células secretar Cl⁻ en respuesta a un aumento intracelular de AMPc. La adición de una sola copia normal del gen CFTR a células de fibrosis quística mejora los defectos de la regulación del canal de Cl⁻, tal como se esperaría para una enfermedad recesiva. En este caso, el uso de retrovirus para transferencia de CFTR-cADN es ineficiente por el bajo recambio celular del epitelio respiratorio. El adenovirus recombinante como vector ha mostrado mejores resultados y la única limitación en este momento sería la incapacidad del adenovirus para replicarse, de tal manera que la infección estaría limitada a las células inicialmente infectadas (7-9).

Extensos estudios preclínicos demostraron que los riesgos para el hombre de la terapia génica usando adenovirus eran bajos y en 1993 se propuso y se inició el primer estudio en humanos aprobado por el National Institutes of Health, el que aún no concluye.

Quedan muchas preguntas sin responder: ¿Qué tipo de célula del epitelio respiratorio es el blanco más apropiado para la transferencia genética? Si bien hay estudios que sugieren que la instilación intratraqueal es suficiente para que el

* Profesor Auxiliar de Medicina, Depto. de Enfermedades Respiratorias.

** Profesor Adjunto de Anatomía Patológica, Departamento de Anatomía Patológica

virus colonice los tipos principales de células del epitelio respiratorio (11), se desconoce en qué células radica principalmente el defecto en la fibrosis quística. ¿Cuáles son las consecuencias de la expresión o sobreexpresión ectópica de la proteína CFTR o de A1AT? ¿Es posible obtener un efecto terapéutico si la eficiencia de la transferencia genética es menos del 100%? ¿Cuál será la mejor estrategia para obtener una reconstitución de la función estable y eficiente *in vivo* sin exponer a los pacientes a un riesgo excesivo?. Las transferencias *in vivo* en animales de experimentación han permitido la producción de proteína hasta 90 días después de la transfección, pero se desconocen efectos secundarios a largo plazo.

OXIDANTES, ANTIOXIDANTES Y MUSCULOS RESPIRATORIOS

En la célula viva se producen constantemente radicales libres y otras especies reactivas derivadas del oxígeno, a partir tanto de procesos metabólicos esenciales para las células, como de fenómenos patológicos. Existen, por otro lado, sistemas celulares encargados de la protección contra oxidantes (Figura 1) que funcionan en forma coordinada, entre los que se cuentan sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa) y sistemas no enzimáticos (vitamina A, vitamina E, glutatión (GSH), etcétera). Cuando la producción de especies reactivas sobrepasa

la capacidad de las defensas antioxidantes, el organismo queda expuesto a sufrir daño por oxidantes (12).

En los últimos años ha habido un interés creciente por investigar la participación que podrían tener distintos compuestos oxidantes en patología humana. Múltiples evidencias apoyan la participación de especies reactivas derivadas del oxígeno en diversas enfermedades pulmonares. Debido a su gran superficie, el aparato respiratorio está expuesto al efecto de oxidantes que llegan por la vía aérea, como el dióxido de nitrógeno y el ozono, entre otros. Además, en muchas condiciones caracterizadas por acumulación de células inflamatorias, el pulmón está expuesto a oxidantes generados a partir de la activación de estas células. Ejemplos de enfermedades pulmonares en las que se ha documentado la participación de especies reactivas derivadas del oxígeno incluyen el síndrome de *distress* respiratorio agudo del adulto, el asma, la fibrosis quística y el daño pulmonar producido por hiperoxia, por cigarrillo y por bleomicina. Si bien la investigación sobre mecanismos de daño por oxidantes en el pulmón lleva varios años, el interés por evaluar la participación de especies oxidantes en la disfunción de los músculos respiratorios es más reciente.

Se sabe que la fatiga de los músculos respiratorios y en especial del diafragma, contribuye al desarrollo de insuficiencia ventilatoria en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas. Sin embargo, las bases celulares y moleculares de la disfunción diafragmática se desconocen. Las evidencias directas e indirectas de participación de radicales libres en el músculo esquelético de las extremidades sometido a ejercicio extenuante y a fenómenos de isquemia reperusión, han estimulado recientemente un notable interés por estudiar el papel

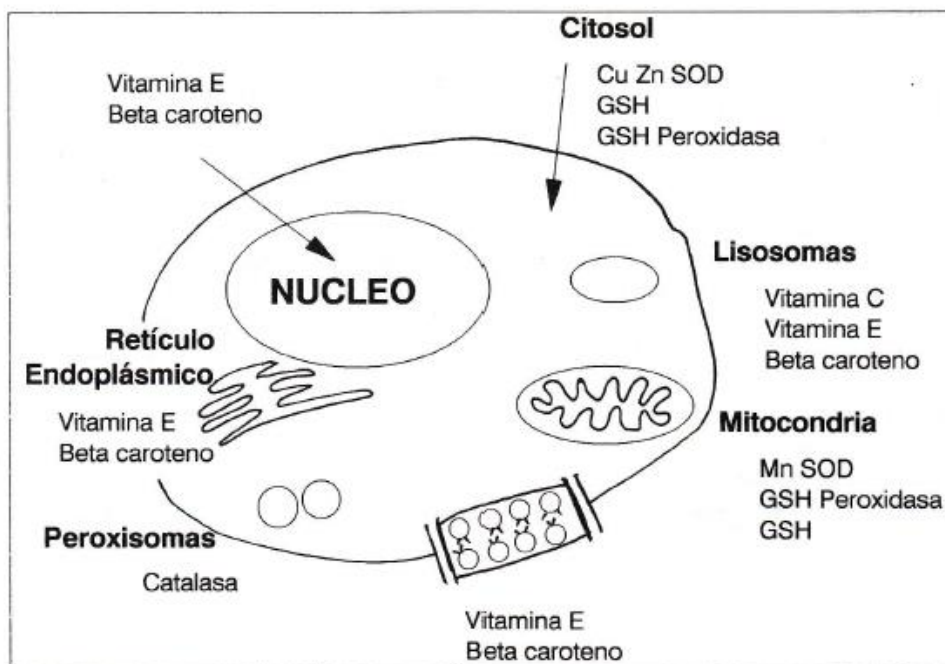


Figura 1. Principales sistemas celulares de defensa antioxidante.

que podrían tener los radicales libres derivados del oxígeno en la fatiga de los músculos respiratorios sometidos a sobrecarga de trabajo.

Se ha postulado que con un ejercicio extenuante, el aumento en la producción de radicales libres tiene la potencialidad de dañar el tejido muscular y que el entrenamiento y/o la suplementación con antioxidantes podría proteger contra este daño.

Si bien el principal proceso biológico involucrado en la producción de radicales libres en las células musculares es el transporte de electrones a nivel de las membranas mitocondriales, existen múltiples otras fuentes, como las membranas de los microsomas, la membrana nuclear y la membrana plasmática. De igual modo, una serie de enzimas presentes en el citosol producen radicales libres como parte del mecanismo de acción enzimática que poseen. La auto-oxidación de compuestos como el ácido ascórbico y la adrenalina constituye otra fuente de radicales libres. Los polimorfonucleares, por otro lado, constituyen una de las fuentes más importantes de radicales libres en condiciones de acumulación y activación de estas células. Neutrófilos, eosinófilos y células mononucleares poseen sistemas enzimáticos de membrana, que al activarse durante la fagocitosis, llevan a la producción de potentes oxidantes como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, ácido hipocloroso y óxido nítrico.

Los radicales libres provenientes de cualquiera de estas fuentes, son capaces de reaccionar y alterar lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, afectando gravemente la función muscular.

Se ha demostrado que el diafragma es capaz de producir radicales libres derivados del oxígeno cuando es estimulado eléctricamente *in vitro*. Se ha encontrado además que el proceso de fatiga, tanto del diafragma como de otros músculos esqueléticos estimulados *in vitro*, se atenúa con el uso de antioxidantes (13,14). También hay evidencias en modelos experimentales *in vivo* de insuficiencia respiratoria, que indican que los radicales libres podrían tener un papel importante en la disfunción diafragmática (15-18).

Se trabaja activamente en determinar las características de las defensas antioxidantes de los músculos respiratorios y los mecanismos de adaptación de éstas frente a la sobrecarga crónica de trabajo muscular inducida por las enfermedades pulmonares crónicas.

Tal vez el aspecto más interesante en el área de los oxidantes y medicina respiratoria está en la posibilidad de diseñar terapias antioxidantes para la prevención y/o tratamiento del daño pulmonar y muscular. Se investiga activamente en diferentes áreas como el bloqueo de la generación de radicales libres, la inactivación de éstos una vez formados, la limitación de las reacciones de oxidación en cadena y en aumentar las defensas antioxidantes tanto localmente, a nivel del aparato respiratorio como a nivel sistémico.

REFERENCIAS

- 1.- Mischler E H. Treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Sem Respir Med* 1985; 6: 271-284.
- 2.- Frizzell R A, Rechkemmer G, Shoemaker R L. Altered regulation of airway epithelial cell Cl⁻ channels in cystic fibrosis. *Science* 1986; 233: 558-560
- 3.- Quinton P M. Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *FASEB J* 1990; 4: 2709-2717
- 4.- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq J-P, Lazdunski M. Altered Cl⁻ ion channel kinetics associated with the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation. *Nature* 1991; 354: 526-528
- 5.- Yankaskas J R, Boucher R C. Transformation of airway epithelial cells with persistence of cystic fibrosis or normal ion transport phenotypes. *Met Enzymol* 1990; 192: 565-571
- 6.- Brody S L, Crystal R G. Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 716: 90-103
- 7.- Rosenfeld M A, Yoshimura K, Trapnell B C, Yoneyama K, Rosenthal E R, Dalemans W et al *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the airway epithelium. *Cell* 1992; 68: 143-155
- 8.- Drumm M L, Pope H A, Cliff W H, Rommens J M, Marvin S A, Tsui L-C, Collins F S, Frizzell R A, Wilson J M. Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 1990; 62: 1227- 1233
- 9.- Rich D P, Anderson M P, Gregory R J, Cheng S H, Paul S, Jefferson D M et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective Cl⁻ channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; 347: 358-363
- 10.- Savransky E, Hytioglou P, Harpaz N, Thung SN, Johnson E M. Correcting the PiZ defect in the alfa-1-antitrypsin gene of human cells by targeted homologous recombination. *Lab Invest* 1994; 70: 676-683
- 11.- Mastrangeli A, Danel C, Rosenfeld M A, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M et al. Diversity of airways epithelial cell targets for *in vivo* recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J Clin Invest* 1993; 91: 225-234.
- 12.- Yu B P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74:139-162.
- 13.- Reid M B., Haack K E., Franchek KM, Valberg P A, Kobzik L, West M S. Reactive oxygen in skeletal muscle. I Intracellular oxidant kinetics and fatigue *in vitro*. *J Appl Physiol* 199-2;73:1797-1804.
- 14.- Reid M B, Shoji T, Moody M R , Entman M. Reactive oxygen in skeletal muscle. II Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol* 1992;73:1805-1809.
- 15.- Anzueto A, Supinski G S, Levine S M, Jenkinson S G. Mechanisms of Disease: Are oxygen-derived free radicals involved in diaphragmatic dysfunction? *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1048-1052.
- 16.- Borzone G R, Zhao B, Merola A J, Berliner L J, Clanton T L. Detection of free radicals by electron spin resonance in rat diaphragm after resistive loading. *J. Appl. Physiol.* 1994;77:812-818.
- 17.- Hartell M G, Borzone G, Clanton T L, Berliner L J. Detection of free radicals in blood by electron spin resonance in a model of respiratory failure in the rat. *Free Rad Biol Med* 1994;17:467-472.
- 18.- Borzone G R, Julian M W, Merola A J, Clanton T L. Loss of diaphragm glutathione is associated with respiratory failure induced by resistive breathing. *J Appl Physiol* 1994;76:2825-2831.

