

INTERFERÓN: MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE FORMACIÓN Y ACCIÓN

Jesús D. Galindo*, Francisco Solano* y José L. Iborra*

Recibido: diciembre 1983

ABSTRACT

Interferon: Biochemical mechanisms of formation and action

The group of **proteins known** as interferons is now one of the most **important** fields of research in Biology. This review **summarizes** our present knowledge about the biochemical mechanisms of synthesis and action of interferons. Discovered by Isaacs and Lindenmann as **agents of viral interference**, **today it is known** that they are **produced** by most of **vertebrates** in **response** to a lot of **appropriate stimuli**. **Here we discuss the classification** of interferons, the human **genes in** which the information for their production and for the protein **machinery** involved **in their response is contained**, the biochemical mechanisms of the interferon production **in cells** treated by an inductor, and those developed **in the surrounding cells** when interferon is secreted. We conclude with the expression of therapeutic use of interferon and the **existence** of similar proteins in vegetal species.

RESUMEN

El grupo de proteínas conocido con el nombre de interferón constituye actualmente uno de los campos de investigación más fecundo de la Biología. El presente es un texto de revisión sobre los mecanismos **bioquímicos** de su síntesis y acción. Descubiertos por Isaacs y Lindenmann como agentes de interferencia vírica, se sabe que los interferones son producidos por la mayoría de los **vertebrados** en respuesta a una serie de estímulos apropiados. Aquí se revisa la clasificación de los interferones, los **genes** humanos que contienen la información tanto para su producción como para la de las proteínas que constituyen el sistema de respuesta, y los mecanismos bioquímicos por los que una célula tratada con un inductor produce el interferón, así como los que desencadenan éste, cuando es segregado, en las células del entorno. Tras una mención al empleo terapéutico de los interferones, se concluye abordando la posibilidad de existencia de fitointerferones.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los productos descubiertos en las **últimas** décadas que más esperanzas ha levantado en diversos campos de la investigación básica y aplicada es el grupo de compuestos conocidos globalmente como interferón (IF). El número de trabajos originales sobre variados aspectos de su síntesis, purificación, secuenciación, propiedades y mecanismo de acción ha ido **incrementándose** de forma muy notable. Habida cuenta la carencia casi **absoluta** de referencias

al tema en la mayoría de los libros de texto generales, incluso en los recientemente publicados, se ha tratado en la presente revisión de dar una visión general sobre el tema, centrada más en los aspectos bioquímicos del **mismo**, esto es, el mecanismo molecular por el que se efectúa la síntesis y acción de estos compuestos. Recientemente (PETSKA, 1983a) se ha publicado un interesante trabajo de revisión por uno de los especialistas en este campo, con un mayor énfasis sobre la purificación y obtención de IF de origen humano, por lo que estos as-

* Departamento Interfacultativo de Bioquímica. Universidad de Murcia. Murcia.

pectos no se consideran en el presente artículo. El lector interesado puede consultar las revisiones generales y números **monográficos** de colecciones periódicas. En este sentido, dos números de *Methods in Enzymology* (Academic Press, 1981), los volúmenes 78 y 79 de la colección, editados bajo la dirección de S. Petska, contienen 14 secciones diferentes (V y IX), con un total de 116 trabajos dedicados al estudio de la Síntesis, producción y purificación, métodos, de ensayo, efectos, etc. Existen, asimismo otras revisiones sobre variados aspectos de este interesante tema (PETSKA, 1983b; LENGYEL, 1982).

2. DESCUBRIMIENTO Y CLASIFICACIÓN

Aunque ya en la década de 1930 se había definido el fenómeno de la interferencia vírica, esto es, que la infección que provocaba un virus en un animal parecía protegerle frente a otro virus que pudiera infectarle posteriormente, no fue hasta 1957 que, en el transcurso de unos estudios sobre dicho fenómeno en un sistema simple, la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (fig. 1), Isaacs y Lindenmann caracterizaron un agente de interferencia vírica, de carácter termolábil, que era liberado por las células que habían sufrido la infección y que permitía a otras células resistir una posterior infección vírica. A esta sustancia la bautizaron con el nombre de interferón. Investigaciones posteriores, llevadas a cabo por numerosos equipos, demostraron que la mayoría de los vertebrados producen IF si se les somete a un estímulo apropiado, y que la acción antiviral que producían en las otras células no era más que uno de sus efectos potenciales.

Actualmente se sabe que al hablar de IF se está tratando de una familia de proteínas, que son segregadas por las células eucariotas en respuesta a infecciones víricas u otros estímu-

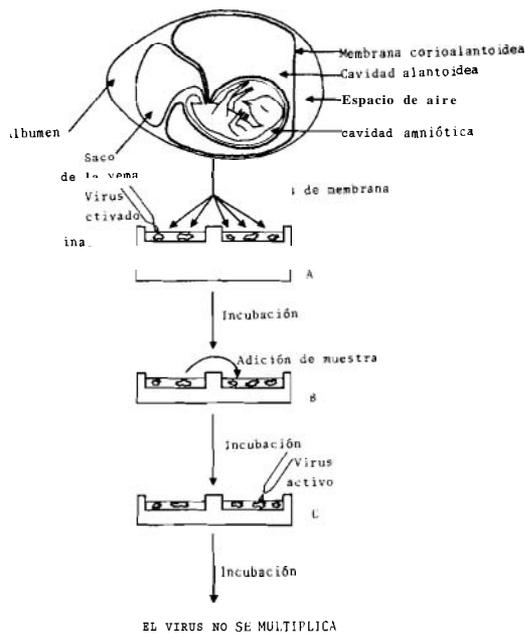


FIGURA 1. Fenómeno de interferencia viral. El esquema muestra las diferentes partes de un embrión de pollo a los 10 días de incubación y la membrana corioalantoidea, material usado por Isaacs y Lindenmann para estudios de interferencia viral. Si parte de la membrana se inocula con un virus previamente inactivado (A), y después de la incubación se añade una muestra de este sistema a otros fragmentos de membrana (B), al añadir sobre éstos virus activos no se multiplicaban (C), efecto atribuido al fenómeno de interferencia viral.

los de diferente carácter, que estimulan a otras células adyacentes a producir otras proteínas que, fundamentalmente, regulan la multiplicación viral, aunque también puede producir otros efectos en ellas (tabla 1). A los IFs, pues.

TABLA 1

EFECTOS PRINCIPALES DE LOS INTERFERONES	
INHIBEN:	<ul style="list-style-type: none"> —Multiplicación de virus animales —Crecimiento intracelular de algunos otros microorganismos —División celular —Motilidad celular —Producción de anticuerpos —Reacciones de hipersensibilidad retardada
ACTIVAN:	<ul style="list-style-type: none"> —Expresión de determinados antígenos de histocompatibilidad en superficie celular y consecuente rechazo de injertos —Fagocitosis por macrófagos

puede considerárseles como mensajeros intercelulares, a modo de «hormona», que actúan en el entorno de la célula productora, como una primera línea de defensa de los organismos contra las infecciones víricas. Por ello, y a pesar de que algunas esperanzas depositadas en el campo terapéutico por la amplitud y potencia de su acción no se han visto satisfechas, no se ha debilitado el interés despertado por su estudio.

A la hora de clasificarlos, hay que tener en cuenta que los IFs pueden ser inducidos, en las células animales, por muchos inductores diferentes (tabla 2), aunque en algunas de ellas ya existen pequeñas cantidades constituyentes de determinados tipos de IF. Hay que indicar que los IFs de diferentes especies animales son distintos y que una misma célula animal puede producir también diferentes tipos de IFs. Por ello, hay que especificar la especie sobre la cual se hace la clasificación.

Hasta hoy se puede decir que existen en seres humanos, al menos, tres familias de IF para los que se ha caracterizado que existe escasa, o

nula, reactividad inmunológica cruzada, a saber: IF α , β y γ , que hasta hace poco se habían clasificado respectivamente IF de leucocito (L), IF fibroblasto (F) e IF inmune (I), por el tipo de células que los producían, y también IF de tipo I (resistentes a pH 2), que incluía los dos primeros grupos (a y β , o L y F), e IF de tipo II (lábil a pH 2), que engloba el grupo γ o I. Hasta recientemente se han aislado 13 subgrupos diferentes del tipo a (denominados a., a., ...a.), dos del tipo β , al menos (β_1 y β_2), y un número no determinado de IF γ .

A pesar de lo afirmado hasta hace poco, no todos los IFs poseen restos carbohidratos unidos a la estructura proteínica. BOCCI (1983) ha señalado, en una revisión sobre el papel de esas fracciones glicosídicas, que mientras los IFs del tipo a y β estudiados han demostrado ser glicoproteínas, las distintas clases de IF α , en general, no lo son; sólo algún subtipo producido por células de ratón o de linfoblastoides de humanos parecen contener unos pocos restos manosa o glucosamina. Carece, además, su estructura primaria de las típicas secuencias señal

TABLA 2. Inductores de interferón

GRUPO	NATURALEZA DEL AGENTE	SUBCLASE
I	Virus	1. ADN, ARNdh. Bacteriófagos.
II	Polianiones	1. Ac. nucleicos (naturales. sintéticos). 2. Otros polifosfatos (polisacáridos ácidos). 3. Polisulfatos (polivinil sulfatos). 4. Policarboxilatos (poliacrílico).
III	Aminas de masa molecular pequeña	1. Diaminas con núcleo aromático. 2. Diaminas con núcleo heteroaromático. 3. Diaminas con núcleo monocíclico alifático. 4. Bioaminas, como histamina. 5. Otras sustancias con funciones amina. 6. Monoaminas ácidas (ac. 2-aminoetiifosfórico).
IV	Antibióticos	1. Cicloheximida.
V	Productos bacterianos	1. Endotoxinas (lipopolisacáridos).
VI	Agentes estimulantes de linfocitos	1. Mitógenos (concanavalina. A). 2. Antígenos específicos. 3. Cultivos mixtos. 4. Anticuerpos antilinfocíticos. 5. Enzimas (galacto-oxidasa).
VII	Microorganismos	1. Bacterias (<i>Brucella abortus</i>). 2. Protozoos (<i>Trypanosoma cruzi</i>). 3. Micoplasmas. 4. Rickettsias. 5. Clamidas.

de glicosilación, tipo Asn-X-Ser o Asn-X-Tre. Sobre el significado posible de los restos carbohidrato se volverá más adelante.

3. GENES QUE CODIFICAN IF HUMANOS Y LAS PROTEÍNAS DE SU RESPUESTA

Como proteínas que son, el primer intermediario en la síntesis de cualquier IF es el correspondiente ARNm. Extrayendo, pues, ARNm de células inducidas y añadiéndolo a sistemas acelulares de síntesis de proteínas, cultivos celulares, o inyectándolo a ovocitos de *Xenopus*, ese ARNm se puede traducir y producir IF biológicamente activo, característico de las células inducidas y del inductor empleado. Una vez comprobada su viabilidad, ha sido posible separar y purificar los ARNm del IF y emplearlo como molde para la síntesis de ADN complementarios (ADN_c) que, luego, han podido ser insertados en plásmidos introducidos en bacterias como *E. coli*, lo que ha permitido una producción notable de IF humano (PETSKA, 1983a). Una vez producidos los IFs, purificados mediante métodos variados, algunos descritos por PETSKA (1983a, 1983b), y determinada su secuencia de aminoácidos, se puede predecir la estructura del gen clonante (el ADN_{c,IF}). Así se ha conseguido determinar, mediante el bambo de dichos ADN, que existen al menos 12 genes de IF a no alélicos, además, de varias modificaciones alélicas (de los que, probablemente, al menos 10 se expresan en humanos), y 2 de IF β . Por estudio comparativo entre las secuencias, se supone que los genes α y β divergieron hace unos 500-1.000 millones de años; son, pues, tan antiguos como los vertebrados. La familia habna surgido por duplicación del gen ancestral hace 20-80 millones de años y, más recientemente, habnan tenido lugar nuevas duplicaciones, al tiempo que algunas de ellas degeneraban a consecuencia de mutaciones deletéreas.

Algunos de los genes de IF se encuentran asociados en el genoma humano. Así, 6 de los del tipo α pueden estar juntos en una porción de 36 Kb del ADN genómico y, al menos, 8 del tipo α y el β_1 , se encuentran en el cromosoma 9. Por otra parte, parecen haberse obtenido recientemente tres nuevos tipos de IF β (β_3 - β_5), uno de cuyos genes parece asignarse al cromosoma 5, y otros dos al cromosoma 2.

Más escaso es el conocimiento acerca de los IF del tipo γ y de los genes que los caracterizan. Parecen ser de mayor tamaño molecular (40.000-70.000 daltons) que los IF α y β (sobre los 20.000) y su clonación no se ha resuelto

satisfactoriamente habida cuenta lo escaso del material de partida.

Por otra parte, los genes que resultan activados por la síntesis de los IF, y que producen la respuesta celular al expresarse, están situados en otro cromosoma diferente. Los primeros intentos de ubicación se deben a TAN *et al.* (1974a), pioneros también en la determinación de genes de síntesis del IF (TAN *et al.*, 1974b). Estos autores demostraron que estaban contiguos los genes que codifican la enzima superóxido dismutasa citoplasmática y los que sensibilizan a la célula al IF; dichos genes se han localizado en la posición distal del brazo largo del cromosoma 21 humano, donde, al parecer, radica la sensibilidad a todos los tipos de IF estudiados. Aunque la proteína codificada por este gen no ha sido aislada, existen pruebas de que posiblemente se trata de un receptor de la superficie celular. Así, por ejemplo, fibroblastos humanos unen cantidades crecientes de IF si se aumenta su dosis de cromosoma 21, y se han obtenido anticuerpos contra componentes de la membrana que bloquean las acciones del IF.

4. MECANISMO DE FORMACIÓN DE IFS: HIPO- E HIPERINDUCCIÓN

Distaba mucho de haberse aclarado el mecanismo mediante el que una célula determinada es inducida a activar los genes que producen un determinado tipo de IF cuando actúa sobre ella un determinado inductor. Una vez el inductor (por ejemplo un ARN_{dh} natural o artificial, como poliI-poliC) interacciona con la célula, se pone en marcha un proceso que en principio podría ser disparado por el simple contacto del inductor con la superficie celular, pues poliI-poliC unido covalentemente a partículas de sefarosa, e impedido, por tanto, de entrar en la célula, induce síntesis de IF. Experimentos posteriores parecieron cuestionar tal eventualidad, al demostrarse que enzimas celulares, o del medio, liberaban pequeñas cantidades de poliI-poliC de la matriz de sefarosa que, por tanto, podían entrar en la célula y ejercer su acción en un centro intracelular. No obstante, por otras pruebas de marcado con isótopos radiactivos (véase más adelante), la acción parece que se realiza a nivel de la membrana celular y básicamente consiste en la unión del inductor a un receptor (R) específico de la superficie celular, aunque este R aún no se ha aislado, ni tampoco su correspondiente segundo mensajero. Esta unión, según todos los datos, conduce a la síntesis de ARNm del IF correspondiente. Poco tiempo después empieza la traducción de dicho ARNm en polisomas unidos a

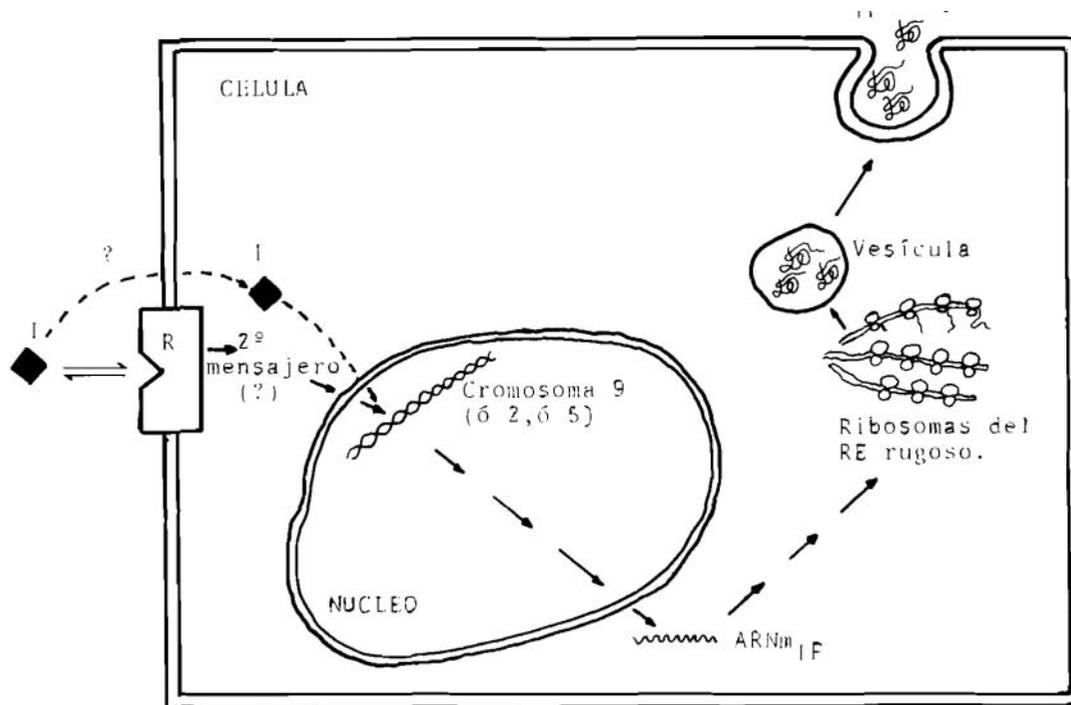


FIGURA 2. Mecanismo de formación y secreción del IF. I, Inductor. R, Receptor de membrana para la unión del inductor.

membranas microsomales (como es normal en el caso de las proteínas segregables), produciéndose posteriormente una rápida secreción de moléculas de IF desde vesículas del retículo endoplásmico.

El modelo se esquematiza en la figura 2. En el caso más habitual, la producción de ARNd_h en la replicación viral anula la represión sobre los genes que codifican los numerosos tipos de IF, se forma el ARNm_{IF} específico, que sale al citoplasma y es traducido en polisomas unidos a membrana.

La síntesis de los IF, generalmente, se efectúa siempre en un corto espacio de tiempo, tras el que sigue un período en el que las células se muestran incapaces de producir más IF (fase de hipoinducción), aunque este fenómeno no es homogéneo respecto de todos los inductores, de todas las células productoras y de todos los tratamientos sucesivos con uno o vanos inductores. Ha podido comprobarse que al inducirse un determinado tipo de células con un inductor como poliI-poliC, si las células son rápidamente tratadas, tras el inductor, con actinomicina D, conocido inhibidor de la transcripción, o con agentes tales como cicloheximida o

puromicina, inhibidores de la traducción, no se produce la síntesis de IF (lo cual es lógico al inhibirse la transcripción del ARNm o su correspondiente traducción). Sin embargo, si los inhibidores se añaden más tarde, se produce una síntesis masiva de IF (hiperinducción).

Esto conduce a postular un mecanismo (figura 3) de autorregulación por retroinhibición de la síntesis de IF: tras producirse ARNm_{IF} y, por consiguiente, el IF, entre los genes que éste induce se encontraría uno que, a su vez, sería responsable de la transcripción de un ARNm codificante de una proteína inhibidora de la síntesis del propio IF. ¿Cómo actúa esa presunta proteína inhibidora que, por otra parte, está por aislar? Se desconoce. Podría impedir la producción uniéndose al propio ARNm_{IF} e impidiendo que siguiera siendo traducido, a los polisomas, o al propio IF ya producido, desnaturalizándolo y/o inhibiéndolo. También se ha apuntado como causante de la hipoinactividad a un factor del suero, denominado factor hiporreactivo del suero (SHF), del que, por otra parte, no se conoce mecanismo de acción.

La hiporreactividad es muy importante sobre todo con inductores de bajo peso molecular

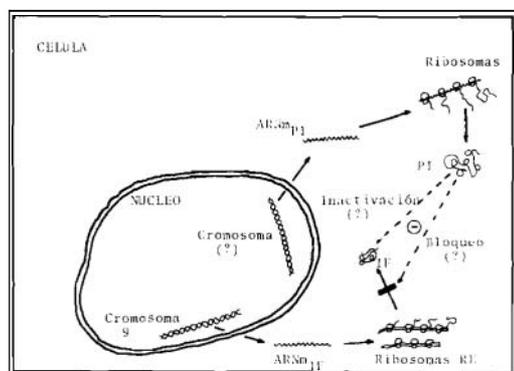


FIGURA 3. Mecanismo de autorregulación del IF (hipoinducción). El propio IF, recién producido, induciría la expresión de un gen que codificaría el ARNm de una proteína, la PI (proteína inhibidora del IF) que, tras su traducción en ribosomas (que no tienen que ser los del retículo endoplásmico), daría lugar a dicha PI, que efectuaría su acción, bien impidiendo que se siga produciendo IF (desacoplando los polisomas del retículo endoplásmico) o bien inhibiendo o desnaturando las moléculas de IF ya producidas (ver texto).

(antraquinona, fluorenona, etc.) y después de cada inducción, la capacidad de producir IF por células de ratón disminuye notablemente. La duración del fenómeno varía, aunque parece necesario dejar pasar un mínimo de 5 días para obtener respuestas normales. Sin embargo, el tratamiento sucesivo con distintos inductores atenúa el fenómeno (o sea, tratamiento con pirimidina y después con antraquinona, etc.).

5. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ESTADO ANTIVIRAL

Se tratará básicamente del establecimiento del estado antiviral por ser la propiedad más estudiada y el efecto más importante del IF.

5.1. ENLACE DEL IF A CÉLULAS Y ESTABLECIMIENTO DEL ESTADO ANTIVIRAL

Parece totalmente comprobado que para inducir estado antiviral en una célula, el IF segregado por la célula productora debe, al menos, interactuar con la superficie de esa otra célula; en relación con ello se ha publicado que IFs α y β , marcados radiactivamente (125 I), se unen específicamente a membranas de estirpes celulares de ratón (L1210s) que, se sabe, responden a esos

IFs, pero no a variantes de esas estirpes celulares (L1210k) que no responden a ellos (AGUET, 1980). En la primera existen receptores específicos para los IF, en un número aproximado de unos mil por célula y cuya constante de disociación tiene un valor de 2×10^{-11} M. Sin embargo, no se detecta paso de radiactividad al interior de las células, por lo que no parece ocurrir internalización. En los casos estudiados, y como ya se adelantó anteriormente, el gen para dicho receptor se ha localizado en la zona distal del brazo del cromosoma 21.

Si el IF no entra en las células, su efecto debe estar mediado por un segundo mensajero. Se han probado varios presuntos candidatos a tal misión. El primer efecto detectado en células de ratón tratadas con IF es un aumento, dependiente de Ca^{2+} de la concentración de GMPc, que comienza unos 5-10 minutos después del inicio de la exposición de las células al IF y que persiste luego otros 5-10 minutos. Por otra parte, también se sabe que no se llega a alcanzar el estado antiviral en células tratadas con IF a las que se les ha facilitado ciertos inhibidores de enzimas como ciclooxigenasa de ácidos grasos. Queda por aclarar si ello indica que alguna prostaglandina, o derivados, pueda mediar en la acción del IF, sabiéndose además que el porcentaje de ácidos grasos insaturados disminuye en membranas de células tratadas con IF. Dicho descenso pudiera relacionarse con el cambio observado en la rigidez de la membrana en células tratadas con IF. También inhibidores de superóxido dismutasa dificultan el establecimiento del estado antiviral. En cualquier caso, el estado antiviral inducido por IFs que actúan sobre la célula no se completa bien en ausencia del núcleo o si la síntesis de ARN y proteínas está inhibida, y cuando se produce, va acompañado de un aumento en las concentraciones de ARNm y ciertas proteínas, principalmente de naturaleza enzimática. Finalmente, el estado antiviral es transitorio y se pierde a los pocos días de la exposición de las células al IF. Todo lo anteriormente descrito se esquematiza en la figura 4.

5.2. ENZIMAS IMPLICADOS EN LA ACCIÓN DEL IF

Mediante su unión al receptor, y por la actuación del segundo mensajero, IF pone en estado de alerta antiviral a la célula, desreprimiendo determinados genes que codifican enzimas que son las encargadas de catalizar el establecimiento funcional del estado antiviral que, sin embargo, sólo será efectivo en presencia de ARNdh (producto implicado en la replicación de muchos vi-

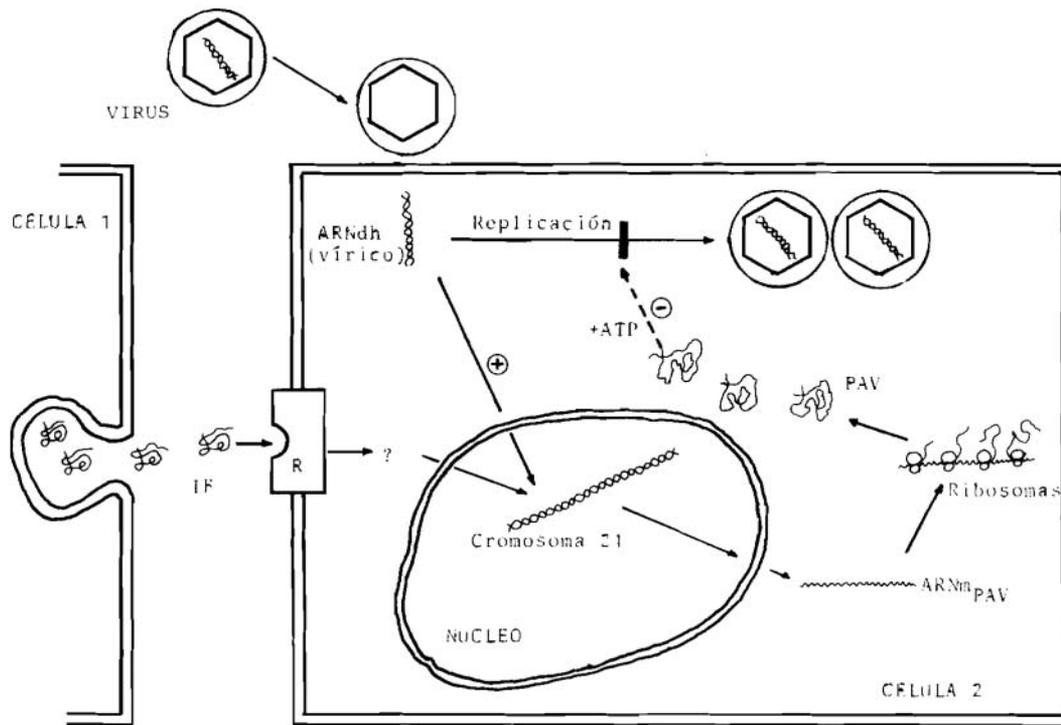


FIGURA 4. Formación del estado antiviral en una célula. Una célula que haya sido previamente alertada por IF producido en otra, pondrá en marcha el estado antiviral cuando se detecte en ella la infección efectiva por virus por la aparición de ARNdh. Este logrará la expresión efectiva de los genes codificantes de ARNm de un grupo de proteínas denominadas PAV (proteínas antivíricas) que, tras inducirse en ribosomas citoplásmicos y en presencia de ATP, impedirán la replicación de determinadas especies.

rus), y ATP. O sea, el IF da el primer timbrado de alarma que sólo será general cuando la presencia de ARNdh en esa célula indique que el peligro es inminente en las células expuestas. El IF induce determinadas enzimas que, sin embargo, quedan en estado latente, no activo, por lo que no desacoplan el metabolismo celular. Sólo al ser infectadas, las células «sensibilizadas» ponen en marcha la activación de esas enzimas latentes, al aparecer ARNdh, y el resultado global es el desacoplamiento de la síntesis proteica de las células infectadas.

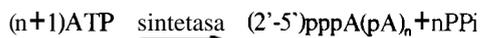
Las enzimas citadas son las componentes de la denominada vía del sistema (2'-5') (A), sintetasa-RNasa, que se descubrió (BROWN *et al.*, 1976) cuando se compararon las velocidades de ruptura de ARNm de reovirus en extractos de un tipo de células tratadas con IF con las velocidades en células control, no tratadas. En células tratadas, la velocidad de degradación de ARNm fue notablemente mayor en presencia de ARNdh, material genómico del reovirus, que en ausencia de dicho material. Por otra parte, el extracto de cé-

lulas control no vio modificada la velocidad de degradación al adicionar ARNdh. Posteriormente se constató que ese aumento de la velocidad degradativa de ARNm también dependía de ATP.

Al trabajar con células EAT tratadas con IF, en presencia de ARNdh y ATP, pudo detectarse, mediante técnicas de fraccionamiento, una elevada dosis de producción, catalizada enzimáticamente, de un pequeño producto termoestable derivado del ATP, que, en otra etapa, activaba en segundo enzima, una endo-RNasa latente. El compuesto termoestable era en realidad una mezcla de oligoadenilatos con unos enlaces inusuales entre las unidades adenílicas, 2'-5', que anteriormente no había sido detectado en ningún material biológico. Estas moléculas, cuya estructura se confirmó por síntesis química, habían sido primitivamente clasificadas como inhibidores de la síntesis de proteínas en células tratadas con IF en las que había presente ARNdh. Posteriormente se demostró que, en realidad, su función era la de activar una endo-RNasa latente.

La enzima responsable de la síntesis, que se ha encontrado y purificado en muchas células de vertebrados, es la denominada (2'-5') (A), sintetasa. Su concentración en dichas células aumenta tras ser tratadas éstas con IF, siendo el grado de inducción variable (desde 10 veces en células HeLa hasta vanos cientos de veces en células de pollo), en un proceso que implica síntesis de ARN y proteínas. Su ARNm ha sido aislado y posee un alto grado de traducibilidad; su ADNc correspondiente ha sido clonado en diferentes especies. En células L929 de ratón no se han observado diferencias en el modelo inductivo por IF α y β , siendo más lenta por IF γ en células HeLa. El nivel de la enzima empieza a aumentar en el período comprendido entre 3-5 horas después del tratamiento, y su concentración máxima se alcanza a las 15 horas (BROEZE *et al.*, 1981).

(2'-5') (A), sintetasa. pues, en presencia de ARNdh y ATP. es capaz de transformar más del 97% del ATP presente en especies (2'-5') oligonucleotídicas, de acuerdo al esquema:



Aunque se acepte la notación (2'-5') (A),, puede observarse en el extremo 5' un grupo trifosfato. El valor de n varía entre 1 y 15, aunque los productos más abundantes son los di-, tri- y tetra-, y su abundancia relativa disminuye al aumentar la cadena, a partir de $n > 4$. El producto biológicamente más potente es el número. Los distintos oligonucleótidos pueden separarse por cromatografía líquida de alta presión o cromatografía de intercambio iónico en urea 7M. La enzima ha sido aislada de numerosas fuentes. y su masa molecular oscila entre 105.000 (determinada por SDS-PAGE) y 85.000 dalton (por velocidad de sedimentación en gradiente de sacarosa). Presenta actividad máxima cuando la concentración de ARNdh (peso/volumen) es aproximadamente la mitad de la de la enzima. ARNdh < 30 pb no activa la enzima, mientras que el que posee entre 65 y 80 pb, origina activación máxima.

La sintetasa puede también adicionar, por enlace (2'-5'), uno o más residuos adenilato u otro nucleótido diferente de adenilato, a una amplia variedad de compuestos que tengan nucleótidos adenilato en el extremo 3'-terminal, tales como NAD⁺; un nucleótido que no sea adenilato a (2'-5') (A),, y, al menos, un adenilato a los ARNt.

No se conoce con exactitud el mecanismo de actuación de los oligoisoadenilatos. Cuando su nivel sube en células tratadas con IF e infectadas con virus, se produce una notable inhibición de la síntesis de proteínas. gracias a su efecto activador sobre una enzima latente en la célula. una endorribonucleasa (RNasa), cuya concentración no aumenta como consecuencia del tratamiento

con IF y ARNdh (aunque el nivel constitutivo varía mucho de unas células a otras), sino que se convierte en una especie enzimática fuertemente activa que degrada rápidamente ARNm y oligonucleótidos, incluidos los propios (A),. La activación de esta RNasa, denominada RNasa_L (L=latente), es reversible. pues la eliminación de los (A), de la enzima activada (por ejemplo, por filtración en gel) la vuelve nuevamente a su estado latente, y una adición de los oligonucleótidos, reactiva de nuevo la RNasa. Parece que la activación implica la unión física del (A), a la enzima, pues mientras que una disolución de (A), libre pasa por un filtro de nitrocelulosa, una preparación parcialmente purificada de RNasa_L hace que quede retenido en el filtro. Además, el agente que retiene (A), copunifica con RNasa, en técnicas tales como cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel.

La masa molecular de RNasa, es de 185.000 dalton y la activación no produce un cambio de tamaño apreciable. La enzima activa rompe ARN monohebra virales y ARNm celulares a velocidades muy diferentes, por lo que parece discriminar entre ellos. Sin embargo, hay datos contradictorios: *in vitro*, el sistema (A), sintetasa-RNasa_L parece romper tanto ARNs virales como del huésped. sin discriminar, pero *in vivo* (por ejemplo, en células L929 infectadas por reovirus; NILSEN *et al.*, 1980), la síntesis proteica viral es inhibida mucho más intensamente que la del huésped, quizá porque la presencia necesaria del ARNdh introduzca un factor de discriminación. De hecho, si a un extracto de células tratadas con IF se añade ATP y un ARN viral de virus VS, al que se une artificialmente poliU a la zona PoliA del ARN, y a su vez este ARN viral se enlaza covalentemente al ARNdh, se degrada mucho más rápidamente que otro. idéntico, no enlazado al ARNdh. Sin embargo, no se ataca el ARNdh. En cuanto a la especificidad de enlace atacado, rompe las secuencias del tipo UA, UG y UU por el extremo 3', dando productos con un 3'-(P) terminal. La participación de uracilo está claramente establecida, pues de los 4 homopolinucleótidos sintéticos sólo es hidrolizado el poliU.

Como consecuencia del enlace inusual, (2'-5') (A), resiste a numerosas nucleasas, pero es degradado en extractos de varios tipos de células por otra enzima latente en ellas, y cuyo nivel se incrementa entre 4 y 5 veces por el tratamiento de ciertos tipos de células con IF. Esa enzima es la fosfodiesterasa (2'-5')P, o (2'-5')PD, de masa molecular aparente 40.000 dalton, que rompe el oligoisoadenilato según la reacción:



eliminando así al activador de RNasa_L, por lo que es claramente una enzima antagonista de ésta, lo que implica una posible función de control. En general, hidroliza enlaces fosfodiéster con una actividad muy parecida a fosfodiesterasa de veneno de serpiente, aunque con mayor especificidad por enlaces 2'-5' que 3'-5'. La presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' no afecta a la hidrólisis, pero si está en 3' el ataque es bloqueado, posiblemente por impedimento estérico sobre 2'. También puede hidrolizar otros polinucleótidos, y entre ellos destaca la eliminación de los extremos CCA de los ARNt.

5.3. BLOQUEO DE LA MAQUINARIA SINTETIZADORA DE PROTEÍNAS

La necesidad de ARNdh y ATP para acelerar la degradación de ARN en extractos de células tratadas con IF, y la cada vez mayor evidencia de multitud de proteínas que se activan o inactivan por mecanismos de fosforilación o desfosforilación, llevó a pensar si el ARNdh podría inducir un cambio global significativo en el nivel de fosforilación proteínica de células tratadas con IF frente a otras células control. Pudo demostrarse rápidamente que, en las primeras, la adición de ARNdh produce fosforilación de dos proteínas (P₁, masa molecular 67.000 y P₂, 37.000 dalton), lo que no ocurría, en grado significativo, en células control.

Los estudios subsiguientes llevaron a determinar que P₁ copurificaba con una proteína dependiente de ARNdh, a partir de diferentes fuentes celulares tratadas con IF. La proteína dependiente de ARNdh induce la síntesis de IF en células no inducidas y, sobre todo, activa a las dos enzimas latentes (en presencia de ATP), que bloquean la síntesis de proteínas. Como ARNdh es un intermediario, o producto secundario, en la replicación de muchos virus, puede considerarse como una señal celular que revela la presencia en la célula de virus replicantes que es preciso detener.

La adición a sistemas acelulares sintetizadores de proteínas de preparaciones de proteína dependiente de ARNdh activa, lleva a inhibición de la iniciación de la síntesis de proteína, lo que parece deberse a fosforilación de e-IF2.

El mecanismo molecular por el que el tratamiento de células con IF lleva al establecimiento

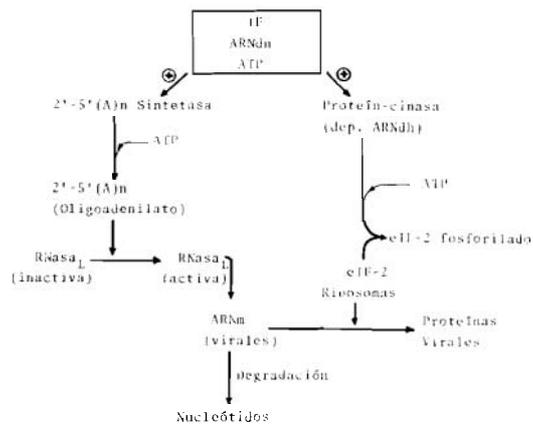


FIGURA 5. Mecanismo molecular de acción de las PAV. En presencia de ARNdh y ATP, células tratadas con IF, mediante el mecanismo mostrado por el esquema, producen las PAV activas: RNasa (que, por acción de los oligoadenonucleótidos (2'-5')(A)_n, pasa a su forma activa RNAasa L_{1a} y proteína dependiente de ARNdh) que, conjuntamente, al degradar los ARNm virales y desacoplar el inicio de la traducción, impiden la replicación de los virus al inhibir la traducción de sus ARNm (ver texto).

del estado antiviral está resumido en la fig. 5. La presencia del IF induce la síntesis de las enzimas (2'-5') (A)_n sintetasa y proteína dependiente de ARNdh, pero quedan latentes sin alterar el metabolismo. ARNdh induce la síntesis de IF en células no inducidas y, sobre todo, activa a las dos enzimas latentes (en presencia de ATP), que bloquean la síntesis de proteínas. Como ARNdh es un intermediario, o producto secundario, en la replicación de muchos virus, puede considerarse como una señal celular que revela la presencia en la célula de virus replicantes que es preciso detener.

6. POSIBLE PAPEL DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LOS IF

Una vez discutida la síntesis y el mecanismo de la acción antiviral de los IF, se comenta la posible relevancia de la fracción glicosilada de algunos IFs. Ya se ha señalado (BOCCI, 1983) que parece probado que no todos los IFs poseen dicha fracción carbohidrato; por ejemplo, casi todos los subtipos estudiados de IF α . Sin embargo, los β y γ sí están glicosilados; así, el más estudiado de entre los β , el IF β humano, posee una señal de glicosilación (Asp-Asp-Ser) en sus posiciones 72-74, con una presencia variable de ácidos siálicos, y en cuanto al IF γ humano se ha propuesto que se trata de una especie molecular única, de

naturaleza inequívocamente glicoproteica, aunque con diferente grado de sialización según el inductor que lo produce.

¿Qué papel, pues, pueden cumplir dichos restos **carbohidratos** en aquellos **IFs** que los poseen? Los tres tipos de **IFs** son proteínas **segregables**, con una señal hidrofóbica de 20-23 **aminoácidos**, a pesar de lo cual **IF α** no precisa de azúcares para ser segregado, mientras la producción de **IF β** y **IF γ** se detiene si se emplea tunicamicina, **inhibidor** de la glicosilación de proteínas dependiente de transportador lipídico. Como otros **inhibidores** de la glicosilación producen resultados semejantes, se ha apuntado que la caída en su producción se debe a detención de la glicosilación y no al bloqueo de la síntesis de proteínas; la presencia de la fracción azucarada puede significar una especie de «salvoconducto» que impide que los **IF β** y **IF γ** entren en compartimentos celulares inadecuados en los que pueda acelerarse su proteolisis.

Aparte de ese posible papel de los restos azucarados en la síntesis y segregación de los **IFs**, se ha discutido su influencia en la capacidad de **difusión** de los mismos. La administración **intramuscular** o subcutánea de **IF β** o **IF γ** a pacientes en tratamiento, no produce actividad antiviral detectable en plasma, por lo que los clínicos prefieren inyectar estos tipos de **IF** por vía intravenosa. Por contra, los **IF α** difunden rápidamente al plasma aunque se les haya inyectado intravenosa o subcutáneamente. Según estos resultados, los **IFs β** y **IFs γ** quedan aparentemente **fijados** al lugar de inyección (**IFs** histiofílicos), mientras los **IFs α** , de grado de hidrofobicidad menor, se mueven rápidamente hacia el plasma (**IF** plasmafílico). Presumiblemente, en el primer caso, la administración intramuscular o subcutánea de **IFs β** y **IFs γ** va seguida de un «anclaje» de dichas glicoproteínas, producido por la interacción de los **carbohidratos** con los componentes de tipo **lectina** de la matriz extracelular y/o mediante interacciones hidrofóbicas; esto no tiene por qué impedir una posible acción sobre las células del entorno, pues los centros activos del **IF** anclado no se ven afectados. Todos estos datos llevan a una notable cantidad de posibilidades (**BOCCI**, 1983) que están siendo investigadas. No obstante, hay datos que indican que **IF β** humano, sintetizado en bacterias recombinantes y, por tanto, no glicosilado, tampoco avanza mucho tras su inyección intramuscular lo que, de confirmarse, indicaría que la capacidad de «anclaje» local radica en la propia molécula proteínica más que en la fracción carbohidrato.

No parecen los hidratos de carbono indispensables para la mayoría de las acciones biológicas que son capaces de producir los **IFs**, porque **IFs β** desglucosilados siguen poseyendo dichas activi-

dades, aunque sí parecen perder algo de estabilidad térmica. Tampoco ha podido probarse que dicha fracción glicosilada sea la determinante de la indudable barrera interespecífica que los **IFs** tienen y que impide que, por ejemplo, **IF** de ratón pueda emplearse para tratar a seres humanos y viceversa, ni en la especificidad tisular que ciertos **IFs** parecen presentar.

Finalmente, cabe señalar que se ha apuntado la posibilidad de que los restos glicosilados tengan protagonismo en el recambio de los **IFs** circulantes. Estudios farmacocinéticos han demostrado que **IF**, tanto producido endógenamente como administrado exógenamente, desaparece rápidamente del plasma; sin descartar posible catabolismo en las células sobre las que actúa, parece que riñón e hígado son los tejidos que fundamentalmente intervienen; en este sentido se ha demostrado que el hígado discrimina entre **IFs β** y **IFs γ** , rápidamente capturados, e **IF α** , que lo es más lentamente. En cuanto al riñón, se sabe que desempeña un papel fundamental en el metabolismo de estas sustancias, cuya masa molecular (~20.000) hará que se filtren más o menos rápidamente según carga y forma molecular; una vez en el fluido tubular, los **IFs** serán reabsorbidos y degradados en la célula tubular, pero en base a la menor resistencia del **filtro glomerular** al paso de las moléculas menos aniónicas, los **IFs** no glicosilados pasarán más rápidamente que los azucarados (**$\alpha > \beta$** y **γ**). Se obtiene así un cuadro general de supervivencia de los **IFs**: los que poseen azúcares reconocibles por **lectinas** hepáticas o de otros tejidos tendrán una vida circulatoria más corta que la de las moléculas no glicosiladas, al poder ser eliminadas sin necesidad de llegar al riñón. La naturaleza, pues, parece haber montado así un sistema de eliminación eficiente de un grupo de sustancias biológicamente tan poderosas, y tan potencialmente tóxicas, por la cantidad de efectos secundarios indeseables a que pueden dar lugar. En definitiva, la presencia de azúcares en algunos **IFs** no debe ser algo gratuito, aunque aún no pueda afirmarse cuál, o cuáles, sean sus inequívocas funciones.

7. OTRAS ACCIONES DEL IF

Como la tabla 1 indica, el establecimiento de un estado antiviral en las células no es la única acción conocida del **IF**, y el que sea capaz de producir tales efectos celulares en algún caso implica la existencia de mecanismos moleculares inducidos por el **IF** diferentes a la inducción de las enzimas de la vía **(A)_n-sintetasa-RNasa₁**.

En base a mecanismos aún no claramente caracterizados, que aquí no se han descrito y que están en fase de estudio, los **IFs** efectúan otra

notable batena de efectos a nivel celular, de los que se puede destacar la inhibición de la división celular, los importantísimos efectos sobre el sistema inmune, el aumento de la toxicidad en las células *natural killer*, la supresión de la producción de determinados anticuerpos, etc. Esta profusión de acciones ha sido el desencadenante del extraordinario interés en el estudio del IF, por la expectativa de esperanzas sobre su posible uso a nivel clínico; algunas de ellas no se han cumplido totalmente y otras, han obligado incluso a retroceder y estudiar más detenidamente su aplicación terapéutica.

8. USO CLÍNICO Y PROBLEMAS PENDIENTES

Desde el primer momento, los descubridores dejaron entrever la importancia de IF como agente antivírico, pero el mundo científico era escéptico al respecto. Es curioso que el primer uso clínico del IF no se realizase en un hospital, sino en la imaginación de un escritor de *cómic* de ciencia-ficción, Dan Barry, autor de la serie *Flash Gordon*, quien, en un episodio dibujado en 1960, salva a un astronauta de la muerte por un virus extraterrestre con una dosis de IF en los últimos minutos de la vida del personaje. Posteriormente se fue venciendo la resistencia, y en la actualidad el IF ocupa un lugar de privilegio en las atenciones terapéuticas de virólogos y oncólogos, pues en esos campos es donde los resultados han sido más prometedores. En el cáncer, los experimentos indican que el IF es más eficaz en la prevención y desaparición de los ya muy avanzados. El problema estriba en la poca cantidad disponible de IF humano (pues ya se ha señalado la poca actividad cruzada de los IF), aunque los esfuerzos, en trabajo y dinero empleados, y los logros que se están consiguiendo, sobre todo por la recombinación de ADNc de IF humano y su clonación en bacterias, permite continuar esperanzados de cara al futuro, sin dejar de pensar nunca en que surgirán problemas de todo tipo derivados de la toxicidad de los posibles efectos laterales. Como confirmación de lo indicado está el dato (WALGATE, 1982) de que de un grupo de 11 pacientes de cáncer en fase aguda tratados con IF α humano, producido en Francia por el Instituto Pasteur, 4 de ellos murieron por la misma causa, infarto de miocardio, durante el año 1982, y las muertes se atribuyeron al propio IF o a alguna posible impureza, por lo que el ministro francés de Sanidad canceló su uso mientras que la unidad productora del Instituto Pasteur no procediera a repurificar sus dotaciones en base a nuevas pruebas de toxicidad del material. Pero esto no es óbice, al contrario, para

continuar investigando, pues según algunos especialistas, en 1981 el IF estaba siendo empleado sólo al 2% de su potencialidad clínica.

Sin embargo aún quedan muchas preguntas por responder sobre la *bioquímica del IF*; entre otras, ¿por qué tantos tipos diferentes del IF?; ¿difieren en la especificidad de sus células blanco o bien afectan de forma diferente a las mismas células mediante el uso de juegos de mediadores (segundos mensajeros) diferentes que sólo se solapan parcialmente? ¿Cómo inductores tan heterogéneos pueden producir dicha inducción, y hasta qué punto son selectivos? Hay que dilucidar, de forma definitiva, si el IF entra en la célula o, si no lo hace, qué naturaleza poseen los segundos mensajeros que pueda emplear, y cómo controla la expresión de los genes que especifican a los distintos mediadores de sus acciones, y también qué mediadores cumplen una función (por ejemplo, la detención de la replicación de determinados virus o células), y cuáles afectan los procesos inmunológicos. Ni que decir tiene que hay mucho trabajo por delante antes de aclarar todas estas cuestiones.

9. POSIBILIDAD DE FITOINTERFERONES

PIERPOINT (1983) planteó esta posibilidad al indicar que, en una reunión celebrada por la British Royal Society para conmemorar los 25 años del descubrimiento del IF, lo que más sorprendió a muchos participantes no fue el uso de IF en el tratamiento contra algunas enfermedades neoplásicas o infecciones víricas en hígado, pulmón, etc., animales, sino la aparentemente extraña utilización terapéutica de IF humanos (tipos α , β y γ) en la restricción de la multiplicación del virus del mosaico del tabaco (VMT), en hojas de dicha planta. Sorprendió por lo que implicaba de uso interespecífico (no cabe duda que los seres humanos y el tabaco son especies muy alejadas) de un IF, lo que contradecía otros datos contemporáneos, pero no en cuanto a posibilidad de existencia de mecanismos de interferencia en plantas, pues ya desde unos cuantos años antes se habían descrito estados de resistencia inducida en plantas en los que la infección con un virus afectaba la susceptibilidad de la hoja a posteriores infecciones. El descubrimiento de la sensibilidad a IF humanos no hizo sino reactivar el interés por encontrar alguna sustancia de carácter similar al IF que fuera la que habitualmente actúa sobre el mecanismo de interferencia que puso en funcionamiento el IF humano.

En este sentido, SELA (1981) identificó una sustancia producida durante la infección de cultivos de células de tabaco que poseen los genes de resistencia (N o nc), que convierten la expansión

sistémica del VMT en una infección necrótica localizada alrededor del punto de infección, a la que denominó factor antiviral, FAV, que tiene una acción similar a la ahora reivindicada para IF humano. FAV parece ser una glicoproteína fosfolada de masa molecular 22.000 dalton que, como el propio IF, es inducida por ARNd_h y que tiene alta actividad específica. Sela propuso un esquema (en el que se basalafig. 6) que explica la producción del FAV activo, fosfolado, en hojas, cuya puesta en marcha vendría desencadenada por la aparición de formas replicativas de ARN del VMT. El gen N, según esto, produciría una enzima responsable de la modificación de un pre-FAV (procedente de otro gen, el «P») a una forma que ya es fosfolada. Puede observarse la gran similitud de este esquema con lo ya expuesto para IF de animales.

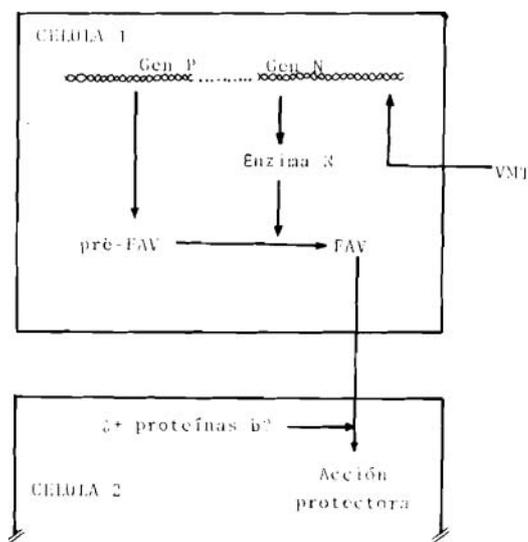


FIGURA 6. Hipótesis de SELA (1981) de liberación del factor antiviral FAV. La célula vegetal posee el gen N (donador de capacidad de localización a la infección por VMT, virus del mosaico del tabaco).

Pero hay otras proteínas que se producen en elevadas concentraciones en hoja de tabaco que tienen capacidad de restringir la replicación vírica tras la infección y que compiten con el FAV en la reivindicación del papel de fitointerferón. Uno de esos grupos de proteínas, al que se ha prestado mucha atención, es la familia denominada proteínas b, o proteínas relacionadas con la patogénesis. Otras cuatro proteínas son también producidas tras la infección de diversos tipos de tabaco con VMT, tres de las cuales parecen ser

isómeros de carga, con masa molecular de aproximadamente 15.000 dalton, mientras que la cuarta es dos veces mayor; todas ellas son resistentes a proteólisis. Sin embargo al tratar los extractos de células infectadas con proteasas nativas o añadidas, se transforman en 5 ó 6 proteínas todavía más resistentes y que son aspirantes también al título de fitointerferón. Cada uno de estos grupos tiene algunas características que lo asemejan a lo ya conocido para IF animal, pero también otras aparentemente contradictorias que impiden la total identificación.

Una nueva sustancia aspirante al papel de fitointerferón es un compuesto detectado en el medio de incubación de protoplastos de células Sansun NN de tabaco con VMT, a las 72 horas de la incubación, y que estaba presente al comienzo de la incubación en protoplastos no infectados, o en aquellos otros infectados que no poseen el gen N. La sustancia, denominada JVR, es reconocida por su capacidad de inhibir la replicación vírica en protoplastos infectados con VMT. Parece probable que el efecto de JVR se haga sobre la replicación, y no sobre la entrada del virus en la célula ni sobre el comienzo de la infección. JVR puede dividirse en dos componentes estables en medio ácido, de masa molecular 26.000 y 57.000 dalton, respectivamente, ambos aparentemente activos a muy bajas concentraciones.

No todos los fenómenos de interferencia en plantas llevan a resistencia inducida, y así, por ejemplo, la infección de hojas de *Nicotiana glutinosa* con VMT puede llevar a «susceptibilidad inducida» de las hojas cercanas. Pese a ello, se conocen bien resistencias inducidas a elementos patógenos no víricos y en células de plantas diferentes al tabaco. Así, algunas cucurbitáceas pueden inmunizarse sistemáticamente contra posteriores infecciones por una primera infección localizada con vanos hongos, bacterias o virus.

Finalmente, hay que decir que quizás alguna de estas sustancias aspirantes ya discutidas pueda finalmente ser calificada sin asomo de duda como IF del tabaco, pero puede también que el proceso de resistencia, tal como el diagrama de Sela sugiere (fig. 6), implique a vanas o a todas ellas, y que, por tanto, FAV, las proteínas relacionadas con la patogénesis, las JVR, etc., no sean rivales entre sí, sino estrechos colaboradores.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ADN: ácido desoximbonucleico.
 ADN_c: complementario.
 ARNd_h: ácido ribonucleico de doble hebra.
 ARNm: ácido ribonucleico mensajero.
 ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.
 ATP: adenosintfosfato.

Células EAT: células de tumor ascítico de Ehrlich.
 FAV: factor antiviral.
 GMP,: 3'-5'-guanosín monofosfato.
 IF: interferón.
 Kb: kilobases.
 pb: pares de bases.
 PD: fosfodiesterasa.
 polil-poliC: poliinosina-policitidina.
 RE: retículo endoplásmico.
 SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamidacon sulfato dodecil sódico.
 VMT: virus del mosaico del tabaco.

REFERENCIAS

- AGUET, M. 1980. High-affinity binding of ^{125}I -labelled mouse Interferon to a specific cell surface receptor. *Nature*, 284: 459-461.
- BOCCI, V. 1983. What is the role of carbohydrates in Interferons? *TIBS*, 8: 432-434.
- BROEZE, R. J., DOUGHERTY, J. P., PICHON, J., JARAYAM, B. M. & LENGYEL, P. 1981. Studies with pure mouse Ehrlich Ascites Tumor Interferons and patterns of induction of (2'-5') (A)-synthetase of a double-stranded RNA-dependent Protein Kinase in mouse cells and human cells. *J. of Interferon Res.*, 1: 191-201.
- BROWN, G. E., LEBLEU, B., KAWAKITA, M., SHAILA, S., SEN, G. C. & LENGYEL, P. 1976. Increased endonuclease activity in an extract from mouse Ehrlich Ascites Tumor cells which had been treated with a partially purified Interferon preparation: dependence on double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69: 114-122.
- LENGYEL, P. 1982. Biochemistry of Interferons and their actions. *Ann. Rev. Biochem.*, 51: 251-282.
- NILSEN, T. N., WEISSMAN, S. G. & BAGLIONI, C. 1980. Role of 2'-5'-Oligo-(adenylic acid)—Polymerase in the degradation of Ribonucleic acid linked to double-stranded Ribonucleic acid by extracts of Interferon-treated cells. *Biochemistry*, 19: 5.574-5.579.
- PETSKA, S. 1983a. Purificación y fabricación de interferones humanos. *Investigación y Ciencia*, 85: 18-26.
- PETSKA, S. 1983b. The Human Interferons. From protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between and beyond. *Arch. Biochem. Biophys.*, 221: 1-37.
- PIERPOINT, W. S. 1983. Is there a phyto-interferon? *TIBS*, 8: 5-7.
- SELA, I. 1981. Antiviral factors from virus-infected plants. *TIBS*, 6: 31-33.
- TAN, Y. T., SCHNEIDER, E. L., TISCHFIELD, J., EPSTEIN, C. J. & RUDDLE, F. H. 1974a. Human chromosome 21 dosage: Effect on the expression of the Interferon-induced antiviral state. *Science*, 186: 61-63.
- TAN, Y. T., CREAGAN, R. P. & RUDDLE, H. 1974b. The somatic cell genetics of human Interferon. Assignment of human Interferon loci to chromosomes 2 and 5. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71: 2.251-2.255.
- WALGATE, R. 1982. Interferon therapy: side effect scare hits French trials. *Nature*, 300: 97-98.