

RIBONUCLEASAS: SU POTENCIAL TERAPÉUTICO EN INFECCIONES VIRALES

Ribonucleases: Theurapetical potential on Viral Infections

XIOMARA ÚSUGA, MARÍA TERESA RUGELES
Grupo Inmunovirología-Biogénesis, Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

Presentado marzo 15 de 2006, aceptado junio 30 de 2006, correcciones agosto 10 de 2006.

RESUMEN

En la actualidad existe un gran interés por identificar proteínas o péptidos antimicrobianos que puedan ser herramientas terapéuticas que eviten el establecimiento o permitan el control de diferentes infecciones. Las ribonucleasas (RNAsas), pertenecientes a la superfamilia Ribonucleasa A, son enzimas que participan en varios procesos fisiológicos, que van desde el procesamiento alternativo del RNA hasta la angiogénesis. Estas enzimas son expresadas por diferentes tejidos y exhiben especificidades variables contra diferentes sustratos de RNA. El potencial terapéutico de las RNAsas se ha sugerido en procesos oncogénicos; adicionalmente, se ha descrito que tienen actividad antiviral directa y el potencial de activar células del sistema inmune innato induciendo su maduración y la producción de citoquinas proinflamatorias. Nuestro grupo de investigación ha realizado estudios que señalan la capacidad de cuatro RNAsas recombinantes: EDN, -4EDN, RNasa A y angiogenina de inhibir la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 en linfocitos T de sangre periférica activados. En este artículo se revisará la clasificación de las ribonucleasas que constituyen la superfamilia RNasa A y se describirá, en forma detallada, lo que se conoce de la función biológica, acción antiviral y mecanismo de acción de las RNAsas a las que se les ha reportado actividad antiviral.

Palabras clave: actividad antiviral, RNasa 1, EDN, ECP, ONC.

ABSTRACT

Currently, there is a great interest to identify proteins or antimicrobial peptides to be included in the therapeutic arsenal for preventing different infectious diseases. Ribonucleases (RNases) that belong to the Ribonuclease A superfamily participate in several physiologic processes, from alternative splicing of RNA to organogenesis. These enzymes are expressed by various tissues and exhibit variable specificities against different RNA substrates. The therapeutic potential of RNases has been suggested for oncogenic processes; in addition, direct antiviral activity and the potential to activate cells from the innate immune system, inducing their maturation and release of pro-inflammatory cytokines have been also associated with these

enzymes. Our research team, have carried out studies that indicate the ability of four recombinant RNases: EDN, -4EDN, RNase A and angiogenin to inhibit HIV-1 replication in activated peripheral blood T lymphocytes. In this article we review the classification of RNases that belong to the Ribonucleasas A superfamily; we describe in detail what is known regarding the biologic function, inhibitory activity and mechanism of action of the RNases recognized by their antiviral activity.

Key words: antiviral activity, RNase 1, EDN, ECP, ONC.

INTRODUCCIÓN

La población de RNA en las células es controlada pos-transcripcionalmente por enzimas denominadas ribonucleasas (RNAsas) que poseen especificidades comunes o diferentes, exhiben un patrón de expresión variable y difieren en su actividad contra diferentes sustratos de RNA (Deshpande y Shankar, 2002). Una sola célula puede contener hasta 20 RNAsas diferentes, las cuales pueden hacer parte de complejos supramoleculares y funcionar en conjunto con otras enzimas (Deutscher y Li, 2001). Las RNAsas y sus homólogos estructurales son moléculas reguladoras que controlan procesos que van desde el procesamiento alternativo a la organogénesis (Beintema y Kleineidam, 1998). Diferentes estudios apoyan el uso de algunas RNAsas para el tratamiento de enfermedades infecciosas y el cáncer, aunque su potencial terapéutico está limitado por su habilidad para penetrar las células (Costanzi *et al.*, 2005).

DEFINICIÓN

Las RNAsas son proteínas con actividad enzimática presentes en bacterias (Ilinskaya *et al.*, 2001), hongos (Kao y Davies, 1999), plantas superiores (Roalson y McCubbin, 2003) y mamíferos (Breukelman *et al.*, 2001), que participan en procesos fisiológicos diversos tales como: muerte celular (Lin *et al.*, 1994), replicación del DNA (Deshpande y Shankar, 2002), transcripción, procesamiento y edición del RNA (Deshpande y Shankar, 2002), defensa del hospedero (Domachowske *et al.*, 1998) y control del crecimiento tumoral (Griffiths *et al.*, 1997).

CLASIFICACIÓN

Las ribonucleasas están divididas en tres grandes familias: la superfamilia RNasa A, la familia T1 y la familia T2. La superfamilia Ribonucleasa A está constituida por las RNAsas de mamíferos y otros vertebrados como aves, reptiles y anfibios (Soochin *et al.*, 2005). Este grupo de proteínas presenta altas tasas de duplicación génica y pérdida de genes de lo que ha resultado un número variable de genes en diferentes especies (Soochin *et al.*, 2005). En el ser humano, los genes que las codifican están ubicados en el brazo largo del cromosoma 14. Sierakowska y Shugar (1977) agruparon las RNAsas humanas en dos categorías: RNAsas secretadas y no secretadas; posteriormente, el grupo de Weickmann *et al.* (1981) cambió el término de secretadas por el de RNAsas de tipo pancreático y Sorrentino y Libonati (1994), introdujeron el término no pancreáticas en reemplazo de no secretadas. Las RNAsas de tipo pancreático incluyen tanto ribonucleasas encontradas en el páncreas como en otros fluidos corporales con propie-

dades catalíticas y estructurales similares a las RNAsas pancreáticas humanas y de bovino. El término de tipo no pancreático se utilizó para las RNAsas que presentan propiedades catalíticas y tienen secuencia similar a la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) o a la RNasa K2 de riñón de bovino. Otros miembros de la superfamilia RNasa A, tales como la RNasa 4 y la RNasa PL3 de hígado porcino constituyen una tercera familia denominadas RNAsas de tipo pancreático/no pancreático, las cuales son estructuralmente más similares a las RNAsas de tipo pancreático pero comparten algunas propiedades catalíticas con ambos tipos de ribonucleasas (Sorrentino y Libonati, 1997).

Nombre génico	Proteína	Especie	Ortólogos	Seudogen en humanos
RNasa 1	Ribonucleasa pancreática	Humano	RNasa A (bovino), RNasa seminal (bovino), RNasa pancreática (ratón), RNasa 1 β , RNasa 1 γ y RNasa 1 δ (rata) RNasa pancreática (tortuga) Onconasa (rana)	No
RNasa 2	Neurotoxina derivada del eosinófilo, EDN	Humano	Grupo de RNAsas EAR (rata y ratón)*	Si
RNasa 3	Proteína catiónica del eosinófilo, ECP	Humano	EAR-1 (ratón), ECP (rata), RNasa 3 (rana)	No
RNasa 4	RNasa 4	Humano	RNasa 4 (ratón), RNasa 4 (rata), RNasa PL3 (porcino)	No
RNasa 5	Angiogenina	Humano	Angiogenina (ratón) y Angiogenina 1 a 6 (rata)	No
RNasa k6	RNasa k6	Humano	RNasa k2 (bovino), RNasa k6 (porcino), RNasa 3 (ratón)	No
RNasa 7	RNasa 7	Humano	No presentan	No
RNasa 8	RNasa 8	Humano	No presentan	No
RNasa 9	RNasa 9	Humano	RNasa 9 (ratón y rata),	No
RNasa 10	RNasa 10	Humano	Train A (porcino), RNasa 10 (ratón), RNasa 10 (rata)	No
RNasa 11	RNasa 11	Humano	RNasa 11 (ratón y rata)	No
RNasa 12	RNasa 12	Humano	RNasa 12 (ratón y rata)	No
RNasa 13	RNasa 13	Humano	RNasa 13 (ratón y rata)	No

Tabla 1. RNAsas pertenecientes a la superfamilia Ribonucleasa A. En esta tabla se listan las RNAsas, hasta ahora descritas, que hacen parte de la superfamilia RNasa A. *RNAsas asociadas a eosinófilos (EAR).

Actualmente algunos autores se refieren a las cinco primeras RNAsas (Tabla 1) como RNAsas pancreáticas según la clasificación anteriormente descrita. Debido a que dichas clasificaciones pueden crear confusión, ninguno de esos términos será usado en esta revisión.

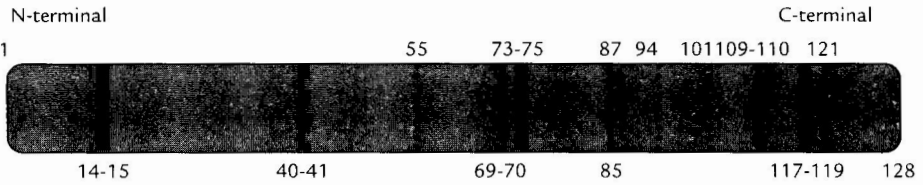


Figura 1. Representación esquemática de una RNasa humana. Las líneas continuas () corresponden a los aminoácidos conservados entre las RNasas 1 a 8. Las líneas en puntos (....) representan cisteínas conservadas entre los miembros de la superfamilia RNasa A. Las líneas discontinuas (---) corresponden a los residuos del sitio activo de las RNasa 1 (H-12, K-41, H-119) los cuales están presentes en todas las RNasas de la superfamilia RNasa A en posiciones similares (Soochin *et al.*, 2005). Las RNasas 9 y 10 no poseen la tríada catalítica ni el péptido señal (Penttinen *et al.*, 2003) y las RNasas 11, 12 y 13 presentan variabilidad en la región de la tríada catalítica (Soochin *et al.*, 2005).

Estas enzimas están compuestas de un péptido señal de aproximadamente 25 aminoácidos y un péptido maduro con alrededor de 130 aminoácidos. Las RNasas presentan varias características estructurales conservadas, entre las cuales son particularmente importantes tres residuos catalíticos (una lisina y dos histidinas) y de seis a ocho cisteínas que forman tres o cuatro puentes disulfuro (Soochin *et al.*, 2005; Figs. 1 y 2). La homología entre las RNasas que hacen parte de la superfamilia RNasa A puede ser entre 20% hasta casi un 100% (Soochin *et al.*, 2005). Las RNasas 9 y 10 no poseen la tríada catalítica ni el péptido señal (Penttinen *et al.*, 2003) y las RNasas 11, 12 y 13 presentan variabilidad en la región de la tríada catalítica (Soochin *et al.*, 2005), lo que sugiere que estas enzimas no poseen actividad ribonucleolítica. Todas estas enzimas exhiben una estructura tridimensional similar; las mayores diferencias se encuentran en otros residuos que forman el sitio activo ribonucleolítico el cual es responsable de las diferentes actividades específicas y preferencias de sustrato. A continuación se describirán, en mayor detalle, las RNasas humanas y la onconasa para las cuales la actividad antiviral ha sido demostrada *in vitro*.

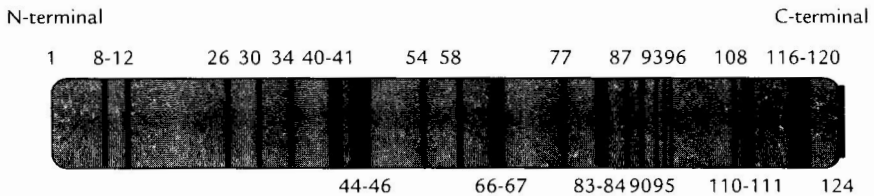


Figura 2. Representación esquemática de la RNasa A bovina. Las líneas continuas corresponden a los residuos conservados entre esta RNasa y la Onconasa.

RNasa PANCREÁTICA HUMANA/RNasa 1

Ésta es una glicoproteína con una masa molecular de 15 kDa sin glicosilación, secretada por un gran número de tejidos tales como: páncreas (Weickmann *et al.*, 1981), riñón (Mizuta *et al.*, 1990), hígado, cerebro, bazo (Futami *et al.*, 1997) y endotelio (Landré *et al.*, 2002); también es producida por células tumorales de adenocarcinoma pancreático (Peracaula *et al.*, 2000). Adicionalmente, se encuentra en plasma seminal (De Prisco *et al.*, 1984) y orina (Futami *et al.*, 1997). Es una de las RNasas de mayor circulación en sangre con una concentración aproximada de 400 ng/mL (Weickmann

et al., 1984). Esta enzima monomérica está constituida por 128 aminoácidos y según el tejido de origen puede presentar diferentes patrones de glicosilación, con tres puntos de glicosilación en el extremo amino terminal en los residuos asparagina-34 (Asn-34), Asn-76 y Asn-88. La enzima de origen urinario presenta los tres sitios glicosilados; la proteína pancreática y parte de la RNasa 1 seminal sólo están glicosiladas en Asn-34 mientras que la enzima del riñón no es glicosilada, al igual que el 50% de las enzimas presentes en plasma seminal y cerebro (Sorrentino y Libonati, 1997). Se ha encontrado alteración en el patrón de glicosilación de la RNasa 1 producida por tejido de adenocarcinoma pancreático y líneas celulares de tumor pancreático. La RNasa 1 en condiciones normales presenta niveles más altos de fucosa y ausencia de ácido siálico en comparación a la RNasa 1 secretada por la línea celular tumoral humana pancreática (Dwek *et al.*, 2003). Aunque la estructura primaria de esta proteína muestra un 70% de identidad con la RNasa bovina A (Soochin *et al.*, 2005), a diferencia de esta proteína, la RNasa 1 humana posee una gran actividad contra el RNA de doble cadena, contiene mayor proporción de residuos básicos, su actividad es diferencialmente influenciada por la fuerza iónica y los iones divalentes y tiene una extensión en su porción carboxilo-terminal de cuatro residuos de aminoácidos (Sorrentino y Libonati, 1997).

Función biológica. Aunque la RNasa pancreática humana no ha sido asociada con alguna función biológica en especial (Sorrentino y Libonati, 1997), se demostró que cataliza eficientemente la degradación del RNA de doble cadena *in vitro* (Sorrentino *et al.*, 2003), lo que sugiere su participación en la respuesta inmune innata. Además, se encontró que es capaz de estimular células dendríticas para la producción de varios factores solubles e inducir su maduración *in vitro* (De Yang *et al.*, 2003). El uso de un conjugado de RNasa pancreática y albúmina de suero humano inyectado en ratones infectados con virus Influenza A e Influenza B, mostró alta actividad antiviral (Zelepuga *et al.*, 2003). Estudios recientes nuestros señalan que la RNasa pancreática recombinante inhibe la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en un cultivo primario de linfocitos T activados (Bedoya *et al.*, en prensa).

Mecanismo de acción. La región amino terminal tiene un papel importante en el clivaje del RNA. Exhibe actividad catalítica específica por pirimidinas con una preferencia marcada por sustrato poli-citosina (poli-C) sobre poli-uracilo (poli-U). Además, esta enzima es dos veces más activa que la RNasa A bovina, por poli-adenina (poli-A) debido a la presencia del residuo aspártico-83 (Asp-83). Su acción catalítica se potencia en altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y muestra actividad óptima a pH 8,0 (Boix *et al.*, 1996).

Inhibidores. Esta RNasa no es citotóxica gracias a la acción neutralizante de la proteína inhibidor de ribonucleasa (IR), glicoproteína citosólica de 50 kDa, cuya función es preservar la integridad del RNA celular (Sorrentino y Libonati, 1997). Gaur *et al.* (2001) demostraron que los residuos lisina-7 (Lis-7), glutamina-11 (Gln-11), Asn-71 y glutámico-111 (Glu-111) en la RNasa pancreática humana son los aminoácidos que interactúan con el IR.

NEUROTOXINA DERIVADA DEL EOSINÓFILO EDN/RNasa 2

Esta proteína es producida y almacenada en eosinófilos (Durack *et al.*, 1981), y se ha encontrado en hígado (Sorrentino *et al.*, 1988), bazo (Yasuda *et al.*, 1990), neutrófilos

(Sur *et al.*, 1998), placenta (Shapiro y Vallee, 1991), monocitos/macrófagos activados (De Yang *et al.*, 2004) y en orina (Beintema *et al.*, 1988). Su peso molecular es de 18,4 kDa; es una proteína termoestable (Motojima *et al.*, 1989), catiónica y con una vida media en sangre muy corta (Boix *et al.*, 1996). La estructura tridimensional de la EDN se caracteriza por la presencia de tres asas que la hacen diferente de las otras RNAsas de la superfamilia RNasa A. Además, presenta una inserción de aminoácidos Asp-115 a tirosina-123 (Tyr-123) que comparte con la proteína catiónica del eosinófilo y la RNasa k6 (Rosenberg, 1998). Posee cinco sitios potenciales para glicosilación en el aminoácido asparagina (Beintema y Kleineidam, 1998). La EDN presenta dos formas alternas resultado de un procesamiento alternativo o de una modificación pos-trasduccional; una de ellas contiene cuatro aminoácidos adicionales (Serina-Leucina-Histidina-Valina) en la región amino terminal, considerada como parte de la secuencia señal ((-4)EDN; Shapiro y Vallee, 1991). La EDN presenta una homología del 67% con la proteína catiónica del eosinófilo. Su actividad neurotóxica se demostró cuando al ser inyectada intratecalmente en conejos indujo un síndrome de rigidez muscular, ataxia y parálisis asociada con pérdida de las células de Purkinje; síndrome conocido como Fenómeno Gordon (Rosenberg, 1998). Sus niveles en sangre se han encontrado elevados en enfermedades asociadas con eosinofilia como por ejemplo en infección por helmintos (Durack *et al.*, 1979), asma bronquial (Tischendorf *et al.*, 1996) y dermatitis atópica (Dahl *et al.*, 1978).

Función biológica. Actúa como quimioquina para células dendríticas maduras e inmaduras mediante la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos p42/44 (MAPK; Sugai *et al.*, 1992). Adicionalmente, se ha demostrado su acción antiviral *in vitro* en líneas celulares crónicamente infectadas con el VIH-1 y contra el virus respiratorio sincitial (Domachowska *et al.*, 1998), y es responsable por la actividad anti-VIH-1 que exhibe el sobrenadante de reacciones alogénicas (Rugeles *et al.*, 2003). Recientemente reportamos que la enzima EDN recombinante inhibe la replicación del VIH-1 en linfocitos T activados (Bedoya *et al.*, en prensa).

Mecanismo de acción. Se ha demostrado su acción de ribonucleasa sobre RNA de cadena sencilla con preferencia sobre poli (U); esta actividad es inhibida en altas concentraciones de NaCl (De Yang *et al.*, 2004) y muestra actividad ribonucleasa óptima sobre RNA de levadura a pH entre 6,5-7,0 (Sorrentino y Libonati, 1997). Es incapaz de catalizar la hidrólisis de nucleótidos cíclicos por la ausencia del aminoácido fenilalanina en la posición 120 (Sorrentino y Libonati, 1997) y de degradar RNA de doble cadena bajo algunas condiciones experimentales (Motojima *et al.*, 1989).

Inhibidores. La actividad de la EDN es neutralizada por el inhibidor de ribonucleasa placentaria humana (Sorrentino y Libonati, 1994); el efecto neutralizante es dependiente de la dosis (Iyer *et al.*, 2005).

PROTEÍNA CATIÓNICA DEL EOSINÓFILO ECP/RNAsa 3

Esta RNasa constituye uno de los mayores componentes granulares del eosinófilo (Olsson y Venge, 1972). Adicionalmente, se ha encontrado en líneas celulares eosinofílicas (Olsson *et al.*, 1977) y en neutrófilos (Sur *et al.*, 1998). Es una proteína secretada, de carácter básico y su propiedad altamente catiónica es dependiente del número de residuos de arginina en la superficie molecular. En su secuencia presenta tres sitios de glicosilación, en la región amino terminal, con oligosacáridos complejos similares

a los encontrados en EDN. ECP presenta un peso molecular de 15,6 kDa sin glicosilar, mientras que las formas glicosiladas pueden variar entre 16 y 22 kDa (Barker *et al.*, 1989). La RNasa 3 presenta un 70% de homología con EDN; las diferencias entre estas dos RNasas radica en el número de residuos de arginina, que en EDN son nueve y en la ECP alcanza un total de 19 residuos. Su actividad ribonucleolítica es mucho menor que la de EDN.

Función biológica. Varias actividades de la ECP han sido caracterizadas *in vitro* tales como disminución del tiempo de coagulación dependiente del factor XII de la cascada de coagulación (Venge *et al.*, 1979), aumento de la fibrinólisis por activación del plasminógeno inducida por uroquinasa (Dahl y Venge, 1979) y regulación de los componentes de la vía clásica del complemento. Además, se demostró en varios estudios que la ECP tiene toxicidad hacia *Schistosoma* (Ackerman *et al.*, 1985), *Trypanosoma* (Molina *et al.*, 1988), *Microphilariae* (Hamann *et al.*, 1990), *Trichinella* (Hamann *et al.*, 1987) y *Plasmodium* (Waters *et al.*, 1987). También se demostró su actividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas independiente de su acción ribonucleolítica (Carerras *et al.*, 2003). Es tóxica para células y tejidos de mamíferos (Maeda *et al.*, 2002). La ECP humana recombinante ha demostrado actividad antiviral contra formas extracelulares del virus respiratorio sincitial (Domachowske *et al.*, 1998).

Mecanismo de acción. La ECP es considerada como una enzima con actividad específica por RNA de cadena sencilla, con preferencia por poli(U). *In vitro*, la ECP muestra actividad óptima a valores de pH entre 6,5-7,0 con RNA de levadura como sustrato y es incapaz de catalizar la hidrólisis de nucleótidos cíclicos (Sorrentino y Glitz, 1991). Debido a su carácter altamente catiónico, la ECP puede unirse a moléculas cargadas negativamente de las membranas celulares, siendo capaz de formar canales selectivos no iónicos o poros estables en la membrana (Young *et al.*, 1986). Además de la formación del poro transmembrana, la ECP se internaliza y por medio de la interacción con la proteína carboxipeptidasa E, en células neuroendocrinas, escapa al ataque proteolítico. Si logra acumularse en exceso y sobrepasa la concentración de los inhibidores de RNasas, induce la degradación de moléculas de RNA citosólico inhibiendo el crecimiento celular (Wu *et al.*, 2004).

Inhibidores. Su acción citotóxica es completamente bloqueada por el inhibidor de RNasa citosólico expresado ubicuamente (Maeda *et al.*, 2002).

ONCONASA/P-30/RANPIRNASA

La onconasa (ONC) es una RNasa aislada de oocitos y de embriones en estadio temprano de la *Rana pipiens*. Es un miembro de la superfamilia RNasa A que presenta un 30% de homología con la RNasa A bovina. A pesar del bajo grado de homología entre las estructuras primarias, la estructura tridimensional de la ONC muestra una topología muy similar a la RNasa A (Ardelt *et al.*, 1994). Posee los principales residuos del sitio activo y tres de los cuatro puentes disulfuro característicos de las RNasas; sin embargo, la ONC parece tener un único mecanismo catalítico debido a un residuo piro-glutamato en su región amino terminal (Boix *et al.*, 1996). Es una proteína con alta estabilidad térmica gracias a su estructura terciaria compacta (Notomista *et al.*, 2000). La ONC aislada de los oocitos de *Rana pipiens* ha sido evaluada en varios ensayos clínicos en humanos como terapia antitumoral (Costanzi *et al.*, 2005).

Función biológica. Se ha demostrado que esta RNasa es citotóxica *in vitro* para varias líneas celulares tumorales de mamífero (Darzynkiewicz *et al.*, 1988) y se ha descrito también actividad antitumoral *in vivo* en modelos animales (Milkulski *et al.*, 1990). Tiene una gran capacidad de inhibir la replicación del VIH-1 en líneas crónicamente infectadas con este virus (Saxena *et al.*, 1996).

Mecanismo de acción. ONC muestra una actividad específica disminuida hacia sustratos específicos en comparación con la RNasa A; exhibe preferencia por poli(U) y por poli-guanina(poli-G). Su actividad óptima se alcanza a pH 5,5. Estudios previos en modelos animales indican que la citotoxicidad de ONC se debe a su capacidad de unirse a la superficie celular, entrar al citosol y degradar el RNA causando la muerte celular (Wu *et al.*, 1993). Jordanov *et al.* (2000) reportó la especificidad de ONC por RNA de transferencia, sin afectar el RNA ribosomal y mensajero. Las células tratadas con ONC presentaron signos de apoptosis similares a los inducidos por caspasa-3, que fueron independientes de la inhibición de la síntesis de proteínas.

Inhibidores. Las RNasas de anfibios no son bloqueadas por el inhibidor de ribonucleasas placentarias de mamíferos (Beintema y Kleineidam, 1998), lo que puede explicar su alta citotoxicidad en células de mamíferos.

PAPEL ANTIVIRAL DE LAS RIBONUCLEASAS

Los mamíferos están constantemente expuestos a una gran cantidad de microorganismos contra los cuales responden a través del sistema inmune innato y adaptativo. La inmunidad innata representa la primera línea de defensa que es rápidamente activada en respuesta a la invasión microbiana, de la cual hacen parte diferentes células y factores solubles. En los últimos años, varios de estos factores solubles con actividad microbicida, entre ellos las RNasas, han suscitado particular interés por el potencial terapéutico que tienen.

Se ha propuesto que algunas RNasas se unen a la superficie celular, gracias a su carácter altamente catiónico, entran al citosol y degradan el RNA induciendo la muerte celular. Esta acción catalítica *per se* de las RNasas hace parte del mecanismo antiviral de estas enzimas, tal como se ha sugerido para la ONC y la ECP, las cuales degradan el RNA ribosomal. La acción citotóxica sobre la célula blanco limitaría la replicación viral. Adicionalmente, se ha sugerido una acción directa de las RNasas, particularmente de la ONC sobre el RNA viral en cultivo de células H9 infectadas con el VIH-1 (Saxena *et al.*, 1996). En el caso de virus DNA, la acción catalítica de las RNasas podría darse después de la transcripción, una vez se hayan producido los RNAm. Otro mecanismo efector es la acción quimiotáctica y por ende pro-inflamatoria, como la actividad exhibida por EDN. Al reclutar células dendríticas se induce la producción de factores quimiotácticos para otras células del sistema inmune; de esta manera, EDN potencia la respuesta innata y promueve la inmunidad adaptativa que permitiría eliminar más fácilmente la infección viral (Shapiro y Vallee, 1991).

El potencial terapéutico de las RNasas fue inicialmente explorado por Glukhov *et al.* (1976) al usar la RNasa 1 para el tratamiento de pacientes infectados con el virus de la encefalitis *Tick-borne*. Después del tratamiento, se observó una rápida resolución de los

síntomas meníngeos y de la pleocitosis en el fluido cerebroespinal. Desde entonces, se han realizado varios estudios que han evaluado el uso terapéutico de estas enzimas en otros modelos, particularmente tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*. Utilizando EDN purificada, a partir de preparaciones comerciales de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), se observó una disminución del crecimiento de una línea celular derivada de Sarcoma de Kaposi, KSIMM, la cual fue dependiente de la dosis. Igualmente, se analizó un péptido sintético de 16 residuos, similar a la secuencia activa de la enzima -4EDN, el cual exhibió un efecto citotóxico dependiente de la dosis, sobre la misma línea celular (Dricu *et al.*, 2004). La ONC también ha sido evaluada como agente antitumoral en estudios de fase II en pacientes con mesotelioma maligno (Milkulski *et al.*, 2002) y en estudios de fase I administrándola en forma intravenosa a pacientes con diferentes tipos de tumores, quienes habían presentado resistencia a otras terapias (Milkulski *et al.*, 1993). Esta RNasa demostró una buena actividad antitumoral y un perfil de toxicidad tolerable. Actualmente se están realizando estudios de fase III con esta RNasa para el tratamiento del cáncer de pulmón, pancreático y mesotelioma maligno.

CONCLUSIONES

Basándose en estudios realizados *in vitro* y algunos *in vivo*, es evidente que las RNasas tienen actividad antimicrobiana potencial, y un papel importante en iniciar y amplificar la respuesta inmune innata y adaptativa contra la invasión microbiana. La actividad antiviral demostrada para estas RNasas abre un nuevo campo de estudio dirigido a la creación de una nueva clase de agentes antivirales usando estas proteínas o formas modificadas.

AGRADECIMIENTOS

Esta revisión hace parte del proyecto financiado por Colciencias y la Universidad de Antioquia, código 115-04-12948.

BIBLIOGRAFÍA

- ACKERMAN SJ, GLEICH GJ, LOEGERING DA, RICHARDSON BA, BUTTERWORTH AE. Comparative Toxicity of Purified Human Eosinophil Granule Cationic Proteins for Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg. 1985;34:735-745.
- ARDELT W, LEE HS, RANDOLPH G, VIERA A, MIKULSKI, SM, SHOGEN K, Enzymatic Characterization of Onconase, a Novel Ribonuclease with Antitumor Activity. Protein Sci. 1994;3:S137.
- BARKER RL, LOEGERING DA, TEN RM, HAMANN KJ, PEASE LR, GLEICH GJ. Eosinophil Cationic Protein cDNA Comparison with Other Toxic Cationic Proteins and Ribonucleases. J Immunol. 1989;143:952-955.
- BEDOYA V, BOASSO A, HARDY AW, RYBAK S, SHEARER GM, RUGELES MT. Ribonucleases in HIV-1 Inhibition: Effect of Recombinant RNases on Infection of Primary T Cells and Immune Activation-Induced RNase Gene and Protein Expression. AIDS Res Hum Retroviruses. In press. 2006

BEINTEMA JJ, KLEINEIDAM RG. The Ribonuclease A Superfamily: General Discussion. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:825-832.

BEINTEMA JJ, BLANK A, SCHIEVEN GL, DEKKER CA, SORRENTINO S, LIBONATI M. Differences In Glycosilation Pattern of Human Secretory Ribonucleases. *Biochem J.* 1988;255:501-505.

BOIX E, WU Y, VASANDANI VM, SAXENA S, ARDELT W, LADNER J, YOULE RJ. Role of the N Terminus in RNase A Homologues: Differences in Catalytic Activity, Ribonuclease Inhibitor Interaction and Cytotoxicity. *J Mol Biol.* 1996;257:992-1007.

BREUKELMAN HI, JEKEL PA, DUBOIS JY, MULDER PP, WARMELS HW, BEINTEMA JJ. Secretory Ribonucleases in the Primitive Ruminant chevrotain *Tragulus javanicus*. *Eur J Biochem.* 2001;268:3890-3897.

CARRERAS E, BOIX E, ROSENBERG JF, CUCHILLO CM, NOGUES MV. Both Aromatic and Cationic Residues Contribute to the Membrane-lytic and Bactericidal Activity of Eosinophil Cationic Protein. *Biochemistry.* 2003;42:6636-6644.

COSTANZI J, SIDRANSKY D, NAVON A, GOLDSWEIG H. Ribonucleases as a Novel pro-Apoptotic Anticancer Strategy: Review of the Preclinical and Clinical Data for Ranpirnase. *Cancer Invest.* 2005;23:643-650.

DAHL R, VENGE P. Enhancement of Urokinase-Induced Plasminogen Activation by the Cationic Protein of Human Eosinophil Granulocytes. *Thromb Res.* 1979;14:599-608.

DAHL R, VENGE P, OLSSON I. Variations of Blood Eosinophils and Eosinophil Cationic Proteins in Serum of Patients with Bronquial Asthma. *Allergy.* 1978;33:211-215.

DARZYNKIEWICZ Z, CARTER SP, MIKULSKI SM, ARDELT WJ, SHOGEN K. Cytostatic and Cytotoxic Effects of Pannon (P-30 Protein), a Novel Anticancer Agent. *Cell Tissue Kinet.* 1988;21:169-182.

DE PRISCO R, SORRENTINO S, LEONE E, LIBONATI M. A Ribonuclease from Human Seminal Plasma Active on Double Stranded RNA. *Biochim Biophys Acta.* 1984;788:356-363.

DE YANG QQ, ROSENBERG H, CHEN Q, DYER KD, KUROSAKA K, OPPENHEIM J. Eosinophil Derived Neurotoxin (EDN), an Antimicrobial Protein with Chemotactic Activities for Dendritic Cells. *Blood.* 2003;102:3396-3403.

DE YANG QQ, BIRAGYN A, HOOVER DM, LUBKOWSKI J, OPPENHEIM JJ. Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:181-215.

DE YANG QQ, ROSENBERG HF, RYBAK SM, NEWTON DL, WANG ZY, FU Q, *et al.* Human Ribonuclease A Superfamily members Eosinophil-Derived Neurotoxin and Pancreatic Ribonuclease, induce Dendritic and Activation. *J Immunol.* 2004;173:6134-6142.

DESHPANDE RA, SHANKAR V. Ribonucleases from T2 Family. *Crit Rev Microbiol.* 2002;28:79-122.

DEUTSCHER MP, LI Z. Exoribonucleases and Their Multiple Roles in RNA Metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;66:67-105.

DOMACHOWSKE JB, BONVILLE CA, DYER KD, ROSENBERG HF. Evolution of Antiviral Activity in the Ribonuclease A Gene Superfamily: Evidence for a Specific Interaction Between Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN/RNase 2) and Respiratory Syncytial Virus. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:5327-5332.

DURACK DT, SUMI SM, KLEBANOFF SJ. Neurotoxicity of Human Eosinophils. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:1443-1447.

DURACK DT, ACKERMAN SJ, LOEGERING DA, GLEICH GJ. Purification of Human Eosinophil-Derived Neurotoxin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78:5165-5169.

DRICU A, SERGIU-BOGDAN C, BRISMAR K, BIBERFELD P, ANDERSSON LC. A Synthetic Peptide Derived from the Human Eosinophil-Derived Neurotoxin Induces Apoptosis in Kaposi's Sarcoma Cells. Anticancer Res. 2004;24:1427-1432.

DWEK RA, RUDD PM, DE LLORENS R. Glycosylation of Human Pancreatic Ribonuclease: Differences Between Normal and Tumor States. Glycobiology. 2003;13:227-244.

FUTAMI J, TSUSHIMA Y, MURATO Y, TADA H, SASAKI J, SENO M. Tissue Specific Expression of Pancreatic-Type Rnases and RNase Inhibitor in Humans. DNA Cell Biol. 1997;16:413-419.

GAUR D, SWAMINATHAN S, BATRA JK. Interaction of Human Pancreatic Ribonuclease with Human Ribonuclease Inhibitor. J Biol Chem. 2001;276:24978-24984.

GLUKHOV BN, JERUSALIMSKY AP, CANTER VM, SALGANIK RI. Ribonuclease Treatment of Tick-Borne Encephalitis. Arch Neurol. 1976;33:598-603.

GRIFFITHS SJ, ADAMS DJ, TALBOT SJ. Ribonuclease Inhibits Kaposi's Sarcoma. Nature. 1997;390:568.

HAMANN KJ, BARKER RL, LOEGERING DA, GLEICH GJ. Comparative Toxicity of Purified Human Eosinophil Granule Proteins for Newborn Larvae of *Trichinella spiralis*. J Parasitol. 1987;73:523-529.

HAMANN KJ, GLEICH GJ, CHECKEL JL, LOEGERING DA, McCALL JW, BARKER RL. *In vitro* Killing of Microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by Eosinophil Granule Proteins. J Immunol. 1990;144:3166-3173.

ILINSKAYA O, DECKER K, KOSCHINSKI A, DREYER F, REPP H. *Bacillus Intermedius* Ribonuclease as Inhibitor of Cell Proliferation and Membrane Current. Toxicology. 2001;156:101-107.

IODANOV MS, RYABININA OP, WONG J, DINH T, NEWTON DL, RYBAK SM, *et al.* Molecular Determinants of Apoptosis Induced by the Cytotoxic Ribonuclease Onconase: Evidence for Cytotoxic Mechanisms Different from Inhibition of Protein Synthesis. Cancer Res. 2000;60:1983-1994.

IYER S, HOLLOWAY DE, KUMA K, SHAPIRO R, ACHARYA KR. Molecular Recognition of Human Eosinophil-derived Neurotoxin (RNase 2) by Placental Ribonuclease Inhibitor. J Mol Biol. 2005;347:637-655.

KAO R, DAVIES J. Molecular Dissection of Mitogillin Reveals that the Fungal Ribotoxins are a Family of Natural Genetically Engineered Ribonucleases. J Biol Chem. 1999; 274:12576-12582.

LANDRÉ JBP, HEWETT PW, OLIVOT J, FRIEDL P, KO Y, SACHINIDIS A, *et al.* Human Endothelial Cells Selectively Express Large Amounts of Pancreatic-Type Ribonuclease (Rnase 1). J Cell Biochem. 2002;86:540-552.

LIN JJ, NEWTON DL, MIKULSKI SM, KUNG HF, YOULE RJ, RYBAK SM. Characterization of the Mechanism of Cellular and Cell Free Protein Synthesis Inhibition by an Anti-Tumor Ribonuclease. Biochem Biophys Res Commun. 1994;204:156-162.

MAEDA T, KITAZOE M, TADA H, DE LLORENS R, SALOMON DS, UEDA M, *et al.* Growth Inhibition of Mammalian Cells by Eosinophil Cationic Protein. *Eur J Biochem.* 2002;269:307-316.

MAEDA T, MAHARA K, KITAZOE M, FUTAMI J, TAKIDANI A, KOSAKA M, *et al.* RNase 3 (ECP) Is an Extraordinarily Stable Protein among Human Pancreatic-Type RNases. *J Biochem (Tokyo).* 2002;132:737-742.

MIKULSKI SM, BERNSTEIN E, ARDELT W, SHOGEN K, MENDUKE K. Striking Increase in Survival of Mice Bearing M109 Madison Carcinoma Treated with a Novel Protein from Amphibian Embryos. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:151-153.

MIKULSKI SM, GROSSMAN AM, CARTER PW. Phase I Human Clinical Trial of Onconase P-30 protein) Administered Intravenously on a Weekly Schedule in Cancer Patients with Solid Tumors. *Int J Oncol.* 1993;3:57-64.

MIKULSKI SM, COSTANZI JJ, VOLGELZANG J, MCCACHREN S, TAUB RN, CHUN H, MITTELMAN A, *et al.* Phase II Trial of a Single Weekly Intravenous Dose of Ranpirnase in Patients With Unresectable Malignant Mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2002;20:274-281.

MIZUTA K, AWAZU S, YASUDA T, KISHI K. Purification and Characterization of Three Ribonucleases from Human Kidney: Comparison with Urine Ribonucleases. *Arch Biochem Biophys.* 1990;281:144-151.

MOLINA HA, KIERSZENBAUM F, HAMANN KJ, GLEICH GJ. Toxic Effects Produced or Mediated by Human Eosinophil Granule Components on *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38:327-334.

MOTOJIMA S, FRIGAS E, LOEGERING DA, GLEICH GJ. Toxicity of Eosinophil Cationic Proteins for Guinea Pig Tracheal Epithelium *in vitro*. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139:801-805.

NOTOMISTA E, CATANZANO F, GRAZIANO G, PIAZ FD, BARONE G, D'ALESSIO G, *et al.* Onconase: An Unusually Stable Protein. *Biochemistry.* 2000;39:8711-8718.

OLSSON I, VENGE P. Cationic Proteins of Human Granulocytes. Isolation of the Cationic Proteins from the Granules of Leukaemic Myeloid Cells. *Scand J Haematol.* 1972;9:204-214.

OLSSON I, VENGE P, SPITZNAGEL JK, LEHRER RI. Arginine-Rich Cationic Proteins of Human Eosinophil Granules. Comparison of the Constituents of Eosinophilic and Neutrophilic Leukocytes. *Lab Invest.* 1977;36:493-500.

PENTTINEN J, PUJANTO DA, SIPILA P, HUHTANIEMI I, POUTANEN M. Discovery *in Silico* and Characterization *in vitro* of Novel Genes Exclusively Expressed in the Mouse Epididymis. *Mol Endocrinol.* 2003;17:2138-2151.

PERACLAULA R, CLEARY KR, LORENZO J, DE LLORENS R, FRAZIER ML. Human Pancreatic Ribonuclease 1: Expression and Distribution in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer.* 2000;89:1252-1258.

ROALSON EH, MCCUBBIN AG. S-RNases and Sexual Incompatibility: Structure, Functions, and Evolutionary Perspectives. *Mol Phylogenet Evol.* 2003;29:490-506.

ROSENBERG HF. The Eosinophil Ribonucleases. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:795-803.

RUGELES MT, TRUBEY CM, BEDOYA VI, PINTO LA, OPPENHEIM JJ, RYBAK SM, *et al.* Ribonuclease is Partly Responsible for the HIV-1 Inhibitory Effect Activated by HLA Alloantigen Recognition. *AIDS*. 2003;17:481-486.

SAXENA SK, GRAVELL M, WU YN, MIKULSKI SM, SHOGEN K, ARDELT W, *et al.* Inhibition of HIV-1 Production and Selective Degradation of Viral RNA by an Amphibian Ribonuclease. *J Biol Chem*. 1996;34:20783-20788.

SHAPIRO R, VALLEE BL. Interaction of Human Placental Ribonuclease with Placental Ribonuclease Inhibitor. *Biochemistry*. 1991;30:2246-2225.

SIERAKOWSKA H, SHUGAR D. Mammalian Nucleolytic Enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1977;20:59-130.

SOOCHIN C, JAAP J, BEINTEMA B, ZHANG J. The Ribonuclease A Superfamily of Mammals and Birds: Identifying New Members and Tracing Evolutionary Histories. *Genomics*. 2005;85:208-220

SORRENTINO S, GLITZ DG. Ribonuclease Activity and Substrate Preference of Human Eosinophil Cationic Protein (ECP). *FEBS Lett*. 1991;288:23-26.

SORRENTINO S, LIBONATI M. Human Pancreatic Type and Non-Pancreatic Type Ribonucleases: a Direct Side-by-Side Comparison of Their Catalytic Properties. *Arch Biochem Biophys*. 1994;312:340-348.

SORRENTINO S, LIBONATI M. Structure-Function Relationships in Human Ribonucleases: Main Distinctive Features of the Major RNase types. *FEBS Lett*. 1997;404:1-5.

SORRENTINO S, TUCKER GK, GLITZ DG. Purification and Characterization of a Ribonuclease from Human Liver. *J Biol Chem*. 1988;263:16125-16131.

SORRENTINO S, NADDEO M, RUSSO A, D'ALESSIO G. Degradation of Double-Stranded RNA by Human Pancreatic Ribonuclease: Crucial Role of Noncatalytic Basic Amino Acid Residues. *Biochemistry*. 2003;42:10182-10190.

SUGAI T, SAKIYAMA Y, MATUMOTO S. Eosinophil Cationic Protein in Peripheral Blood of Pediatric Patients with Allergic Diseases. *Clin Exp Allergy*. 1992;22:275-281.

SUR S, GLITZ DG, KITA H, KUJAWA SM, PETERSON EA, WEILER DA, *et al.* Localization of Eosinophil-Derived Neurotoxin and Eosinophil Cationic Protein in Neutrophilic Leukocytes. *J Leukoc Biol*. 1998;63:715-722.

TISCHENDORF FW, BRATTIG NW, BÜTTNER DW, PIEPER A, LINTZEL M. Serum Levels of Eosinophil Cationic Protein, Eosinophil-Derived Neurotoxin and Myeloperoxidase in Infections with Filariae and Schistosomes. *Acta Trop*. 1996;62:171-182.

VENGE P, DAHL R, HALLGREN R. Enhancement of F XII-Dependent Reactions by Eosinophil Cationic Protein. *Thromb Res*. 1979;14:641-649.

WATERS LS, TAVERNE J, TAI PC, SPRY CJ, TARGETT GA, LAYFAIR JH. Killing of *Plasmodium falciparum* by Eosinophil Secretory Products. *Infect Immun*. 1987;55:877-881.

WEICKMANN JL, ELSON M, GLITZ DG. Purification and Characterization of Human Pancreatic Ribonuclease. *Biochemistry*. 1981;20:1272-1278.

WEICKMANN JL, OLSON EM, GLITZ DG. Immunological Assay of Pancreatic Ribonuclease in Serum as an Indicator of Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 1984;44:1682-1687.

WU Y, MIKULSKI SM, ARDELT W, RYBAK SM, YOULE RJ. A Cytotoxic Ribonuclease. Study of the Mechanism of Onconase Cytotoxicity. *J Biol Chem.* 1993;268:10686-10693.

WU Ch, CHANG H, CHANG MD. Membrane-Bound Carboxypeptidase E Facilitates the Entry of Eosinophil Cationic Protein into Neuroendocrine Cells. *J. Biochem.* 2004;382,841-848.

YASUDA T, MIZUTA K, SATO W, KISHI K. Purification and Characterization of a Ribonuclease from Human Spleen. Immunological and Enzymological Comparison with Nonsecretory Ribonuclease from Human Urine. *Eur J Biochem.* 1990;191:523-529.

YOUNG JDE, PETERSON CGB, VENGE P, COHN ZA. Mechanism of Membrane Damage Mediated by Human Eosinophil Cationic Protein. *Nature.* 1986;321:613-616.

ZELEPUGA EA, PONOMAREVA RB, KOLIKOV VM, PAUTOV VD, SHEVELEVA TV, MEDVEDEV ML, *et al.* Conjugates of Pancreatic Ribonuclease and Ligand-Free Human Serum Albumin. *Biomed Khim.* 2003;49:588-596.