



INHIBIDORES DE LA CASPASA 8



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Trabajo de Fin de Grado

Presentado por Rocío Ocaña Campos

Curso 2017/2018



INHIBIDORES DE LA CASPASA 8

Trabajo de Fin de Grado: Revisión bibliográfica

Rocío Ocaña Campos



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Junio 2018

Profesor tutor: Dr. Alberto García Quintanilla

Departamento de Bioquímica y Biología molecular.

RESUMEN

Esta revisión bibliográfica trata de explicar de forma sencilla qué son los inhibidores de la caspasa 8. Para ello se explicará en principio qué es la muerte celular, qué tipos de muerte celular se llevan a cabo en la célula, la vía de muerte celular en la que está implicada esta enzima, otros procesos en los que se encuentra implicada no relacionados con la muerte celular para así entender su importancia y consecuencias de su inhibición. Además, se describirá qué son las caspasas, qué tipos hay, cómo es su mecanismo de acción o cuál es su estructura para poder así entender de una forma más sencilla los diferentes métodos que podemos utilizar para inhibirla. Principalmente hemos dividido los tipos de inhibidores en tres grandes grupos: (1) inhibidores de tipo microARN, tanto los que encontramos en el propio organismo como aquellos que podemos sintetizar, junto con algunos de los ejemplos más relevantes que se han utilizado en investigación; (2) los ratones KO o doble KO con el gen de la caspasa 8 deletado; y por último (3) los inhibidores sintéticos de caspasa 8, incluyendo las modificaciones más importantes que se le hacen para mejorarlos. De cada tipo se explicará cual es el mecanismo de acción llevado a cabo por cada uno de ellos al igual que otros complejos que también participan en el proceso. Finalmente se expondrán algunas de las ventajas e inconvenientes de cada tipo de inhibidor. No obstante, es un tema difícil de abarcar que aún se encuentra en investigación.

Palabras claves: caspasa 8, muerte celular, inhibidor, enzima.

ABSTRACT

This review will focus on the different caspase 8 inhibitors. To achieve this objective, we will start describing the cellular death processes as well as the cellular death pathways in which the caspase 8 is involved. In addition, the implication of caspase 8 in other processes will be discussed. Focusing on the different caspase types, structure, and mechanism of action, will help to find the optimal method to inhibit this important type of enzymes.

The mechanisms to inhibit or avoid the action of caspase enzymes can be divided into three main categories: (1) microRNA type inhibitors (biological and synthetic) that will

be discussed along with some of the most relevant examples that have been used in research, (2) KO mice or double KO mice, with a deletion of the caspase 8 gene, and (3) synthetic caspase 8 inhibitors. The different mechanism of action of each type of inhibitor will be explained as well as the main advantages and disadvantages.

Finally, it is important to note, that the topic of the present review is nowadays under intense investigation and it is presumable that in the next years a lot of new studies will provide important information regarding the optimal strategy to inhibit the caspase 8 and its therapeutical benefit.

Keywords: caspase 8, cell death, inhibitor, enzyme.

INDICE

1. Introducción	4
2. Objetivos	4
3. Metodología	4
4. Resultados y discusión.....	5
4.1 Caspasa 8	5
4.1.1 Proceso de muerte celular	5
4.1.2 Mecanismo de activación	8
4.1.3 Estructura	9
4.1.4 Procesos en los que está implicada	9
4.2 Tipos de inhibidores	10
4.2.1 ARN	10
4.2.1.1 Micro ARN	10
4.2.1.2 Micro ARN sintético	16
4.2.2 Ratones KO	19
4.2.3 Inhibidores sintéticos	22
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30

1. INTRODUCCIÓN.

Las caspasas son enzimas que actúan a modo de tijeras celulares; participan en procesos de muerte celular programada, mantenimiento de la homeostasis y desempeñan un papel clave durante el desarrollo embrionario, así como en la activación del sistema inmunitario y diferenciación celular. Cuando estos procesos se descontrolan pueden desencadenar patologías graves, tales como neurodegeneración, cáncer o autoinmunidad, lo que pone de manifiesto su relevancia. Por ello, la caspasa 8 en particular ha sido objeto de estudio en múltiples artículos como posible diana terapéutica. Es fundamental, por tanto, estudiar y conocer los procesos en los que participa la caspasa 8 y entender las diferentes estrategias que existen para inhibir su actividad.

2. OBJETIVOS.

Con esta revisión se pretende exponer al lector la relevancia de la caspasa 8 en diferentes situaciones biológicas y procesos celulares, e identificar los tipos de inhibidores biológicos y químicos de la caspasa 8 presentes en la naturaleza o empleados en investigación, así como sus mecanismos, ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos, para la posible modulación de enfermedades autoinmunes, infecciones virales, cáncer o trastornos neurodegenerativos.

3. METODOLOGÍA.

La metodología seguida para realizar esta revisión ha consistido en una extensa búsqueda bibliográfica, utilizando para ello como fuente de información la base de datos PubMed, y revistas especializadas del sector como Cell Death and Differentiation, o de alto impacto como Nature, Cancer Cell o Science. A partir del material encontrado se seleccionaron las revisiones y artículos originales más relevantes, y en la medida de lo posible los más recientes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 CASPASA 8.

4.1.1. PROCESOS DE MUERTE CELULAR.

Cada día, el cuerpo humano produce y elimina de forma silenciosa millones de células, gracias a un perfecto equilibrio entre proliferación y muerte celular, con el fin de garantizar la homeostasis celular, así como un correcto funcionamiento en todo momento del cuerpo humano.

Las células pueden morir ya sea de forma accidental o regulada. El primer caso, pese a poder ocurrir *in vivo* como resultado de traumatismos o quemaduras, no constituye un objetivo terapéutico al no poder ser prevenida o modulada (Galluzzi et al. 2015). Por el contrario, las formas de muerte reguladas están codificadas genéticamente y ocurren para ofrecer una respuesta adaptativa a estímulos externos o intracelulares. Por tanto, pueden ser moduladas inhibiendo la transducción de las señales de muerte.

Dentro de los tipos de muerte celular regulada, existen varias clasificaciones según cursen con o sin inflamación, sean dependientes o no de caspasas, o se inicien por estímulos externos o internos.

Dos de las formas más destacadas son la necrosis y la apoptosis (Figura 1). Tradicionalmente la necrosis se ha asociado a muerte accidental, basándose en criterios morfológicos. Sin embargo, se ha visto que también puede estar regulada, por lo que recientemente se ha denominado también necroptosis, para enfatizar este último aspecto. La necroptosis es un tipo de muerte que ocurre en ausencia de la caspasa 8 y que termina provocando la rotura de la membrana celular, por lo que el contenido celular se vierte al medio extracelular, afectando así a las células adyacentes. Se trata por tanto de un tipo de muerte proinflamatoria.

En el extremo opuesto, la apoptosis constituye la principal forma de muerte celular en condiciones fisiológicas. Es un proceso dependiente de caspasas, que puede iniciarse ya sea en respuesta a estímulos externos o bien a estímulos internos de la propia célula, como exceso de proteínas mal plegadas o una catástrofe energética. En este mecanismo, la integridad de la membrana celular se mantiene en todo momento, y

termina con la formación de fragmentos celulares denominados cuerpos apoptóticos, que son posteriormente fagocitados por macrófagos y otras células del sistema inmunitario. Se trata por tanto de un proceso no inflamatorio altamente controlado, que no afecta a las células vecinas (Irachela, 2007).

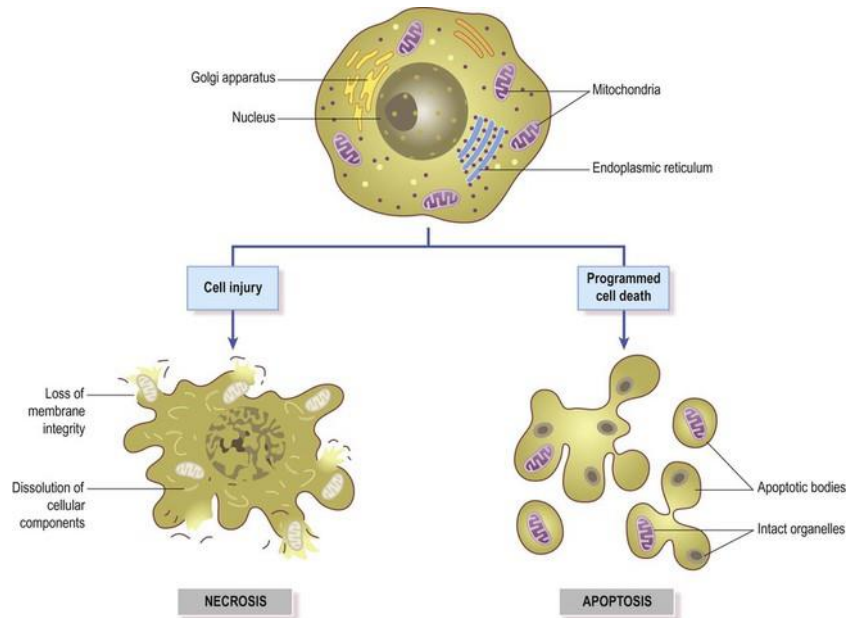


Figura 1. Diferencia entre apoptosis y necrosis.

El nombre de caspasas hace referencia al hecho de que se trata de enzimas con una cisteína en su centro activo y que escinden a las proteínas dianas tras un residuo de aspártico (Cisteinil-ASpartato proteASAS) (Poreba et al., 2013). Las caspasas pueden clasificarse en caspasas iniciadoras, como las caspasas 2, 8, 9 y 10, o en caspasas efectoras, como las caspasas 3, 6 y 7. Mientras que las primeras contienen un dominio DED (Death Effector Domain) o CARD (CASPase Recruitment Domain) y se activan por dimerización, las segundas carecen de éstos y se activan mediante escisión. En ambos casos, cuando están inactivas se denominan procaspasas.

Como se ha comentado anteriormente, la activación de las rutas de muerte puede deberse a un estímulo extracelular o intracelular. Así por ejemplo, la activación de la caspasa 8 se considera un mecanismo de iniciación de la vía extrínseca de la apoptosis, es decir, en respuesta a estímulos externos, mientras que la caspasa 9 está involucrada en la iniciación de la vía intrínseca, donde la mitocondria desempeña un papel importante (Figura 2).

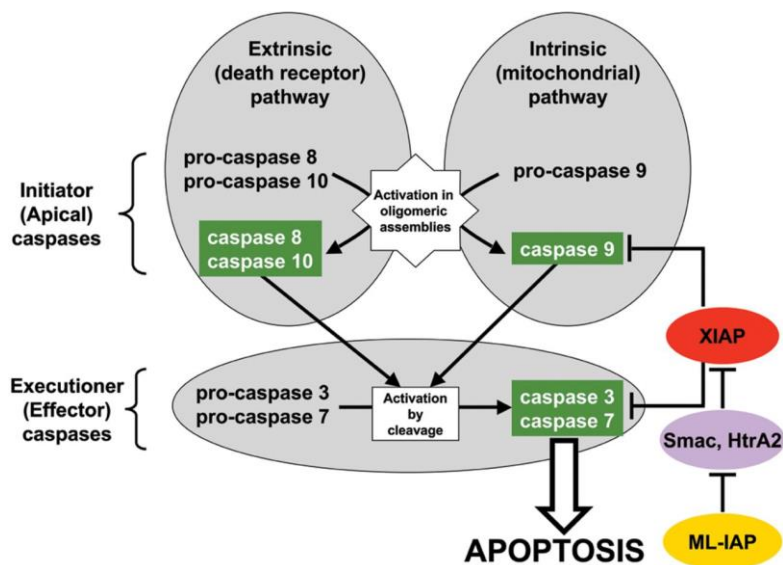


Figura 2. Tipos de caspasas implicadas en la vía apoptótica.

La vía intrínseca está mediada por la liberación del citocromo c y de otros factores proapoptóticos como SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) contenidos en la mitocondria, debido a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Una vez en el citosol, el citocromo c activa a APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) y se forma el apoptosoma junto con la caspasa 9. Por otra parte, SMAC inhibe a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), que se encuentran inhibiendo a la caspasa 9 y a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, permitiendo así que se produzca la activación de estas últimas y se ejecute la apoptosis.

En contraste con esta vía, la vía extrínseca ocurre cuando una señal extracelular se une a los receptores de muerte celular, como FasR (First Apoptosis Signal Receptor) o TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), y se inicia el reclutamiento de diferentes moléculas entre las que se encuentra la caspasa 8 y que desembocan en la formación de la plataforma de señalización DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (García Martínez, 2007).

Una vez activada la caspasa 8, ésta puede escindir directamente a la caspasa 3 para que ejecute la apoptosis, y en algunos tipos celulares, además puede escindir a la proteína BID, para que se desplace a la mitocondria y provoque la liberación del citocromo c y la

posterior activación del apoptosoma, al igual que ocurría en la vía intrínseca (McStay et al., 2008).

4.1.2. MECANISMO DE ACTIVACIÓN.

La caspasa 8 debe dimerizarse para poder autoescindirse. Para ello, puede formar homodímeros de procaspasa 8 o heterodímeros con otra molécula estructuralmente parecida, pero sin actividad catalítica, denominada FLIP. En el primer caso, la caspasa 8 se va a activar completamente, desencadenando la muerte por apoptosis, mientras que en los otros casos, la caspasa 8 no se va a activar por lo que la célula va a sobrevivir, o bien se va a activar de forma limitada, actuando únicamente sobre dianas próximas. En tal caso, la célula se va a activar, tal como ocurre en células del sistema inmunitario. De esta forma, la célula puede controlar el destino celular controlando el grado de activación de la caspasa 8, mediante la formación mayoritaria de homodímeros o heterodímeros de caspasa 8 (Figura 3) (Keller et al., 2010).

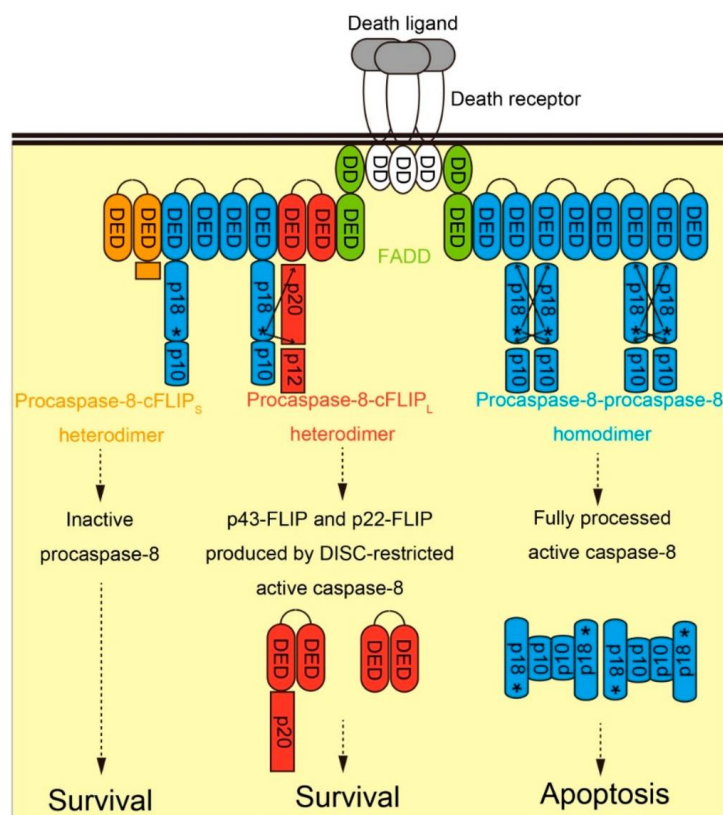


Figura 3. Diferentes destinos celulares según la formación de homodímeros o heterodímeros de caspasa 8.

4.1.3. ESTRUCTURA.

La caspasa 8 posee un dominio N-terminal grande, conocido como prodominio, que contiene dos regiones DED (dominio efector de muerte) y a su vez dos subunidades conocidas como p-10 y p-18 (Figura 4). Además, está formada por 6 alfa-hélices antiparalelas y alifáticas que generan un centro hidrofóbico. Cuando están formando homodímeros, son capaces autoprocesarse, dando lugar a tetrámeros compuestos por dos subunidades grandes y dos subunidades pequeñas (Figura 5) (Elinos-Báez et al., 2003).

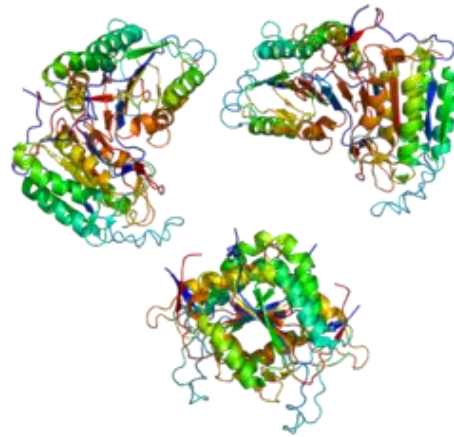
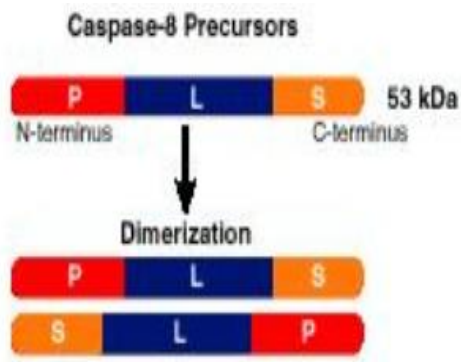


Figura 4. Zonas de dimerización de la caspasa 8.

Figura 5. Estructura 3D de caspasa 8.

4.1.4. OTROS PROCESOS EN LOS QUE ESTÁ IMPLICADA.

También se han descrito algunos casos en humanos en los que la caspasa 8 se encontraba en cantidades deficientes debido a mutaciones puntuales. Esto causaba en los individuos infecciones oportunistas e inmunodeficiencia debido a que la función de células T, NK y linfocitos B se encontraban alteradas, por lo que esta enzima no solo tiene un papel importante en la muerte celular sino también en la respuesta inmune y la activación de citoquinas (Chun et al., 2002).

4.2. TIPOS DE INHIBIDORES.

4.2.1. ARN.

4.2.1.1. miARN.

Los microARN (miARN) son pequeños fragmentos de ARN no codificantes. La secuencia contiene de 21 a 25 nucleótidos, que forman parte del propio organismo, de bacterias o incluso virus. Se ha comprobado que están involucrados en procesos muy relevantes como la defensa inmunitaria, oncogénesis o incluso la propia regulación del desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis de las células. Esta regulación la pueden llevar a cabo de diferentes formas, pero en todos los casos actuando en el proceso de traducción bien sea, inhibiendo la iniciación, elongación, degradando la proteína o con una terminación prematura del proceso (Wan et al., 2018).

Los miARN que se encuentran en organismos eucariotas tienen al menos tres funciones principales: protección frente a agentes virales, regulación genética específica y defensa frente a elementos genéticos transponibles (Green et al., 2005) (Noriega et al., 2016).

Se descubrió que los miARNs estaban implicados en procesos de silenciamiento genético, que perduran en generaciones posteriores. Este proceso se lleva a cabo gracias a la existencia de diferentes complejos enzimáticos como el RISC (complejo enzimático encargado de degradar al ARNm) y DICER, complejo que pertenece a la familia de las ARNasa de tipo III. Este último se encarga de romper al ARN de doble cadena en pequeños fragmentos. Además, se investigó que asociado a DICER se encontraban dos proteínas Ago 1 y Ago 2, conocidas como proteínas argonautas, las cuales tienen función de endonucleasas (Kim and Rossi 2009).

Entre los mecanismos descritos en células eucariotas para originar por sí mismas miARN, se encuentra el PTGS (silenciamiento genético post traduccional). Se encarga de degradar al ARNm citoplasmático mediante la represión de la traducción, por ello tienen que ser complementarios al ARNm que vayan a degradar (Noriega et al., 2016).

El procedimiento que se lleva a cabo para la degradación consiste en la hibridación del miARN con el ARNm, formando estructuras en forma de bucle que lo desestabilizan y dan lugar a su degradación citoplasmática (Noriega et al., 2016).

Los miARN podrían actuar sobre la regulación de la caspasa 8 tanto positivamente, haciendo que aumente la apoptosis, como negativamente inhibiéndola. Algunos ejemplos son:

miARN-150:

El melanoma maligno es un tumor con una alta tasa de mortalidad. Se realizó un estudio con tejidos de pacientes con cáncer de melanoma y con tejidos de controles sin cáncer, para investigar qué posible efecto podría tener miARN-150 sobre la proliferación celular, apoptosis e invasión. Los resultados demostraron que miARN-150 estaba regulado positivamente en las células tumorales, es decir que inhibía la apoptosis y a las proteínas implicadas en ella, incluyendo la caspasa 8 (Figura 6) (Wan et al., 2018).

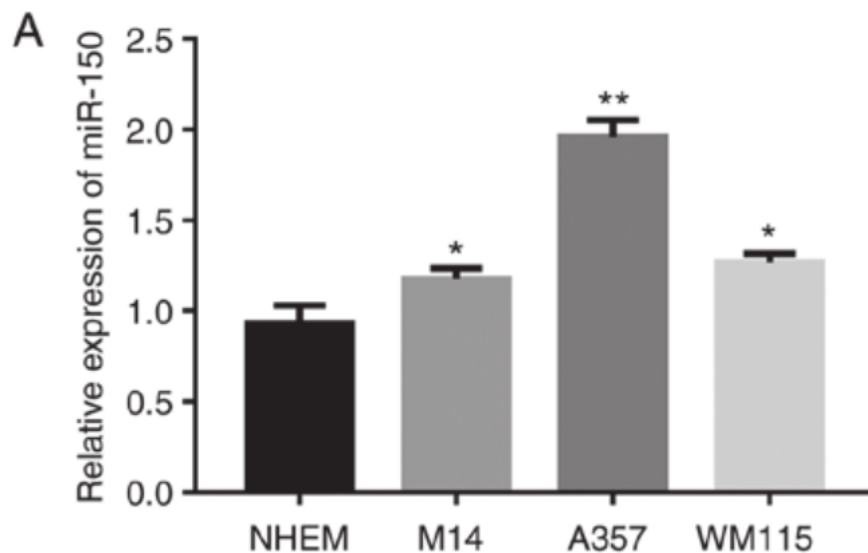


Figura 6. Expresión de miARN-150 en diferentes líneas celulares de melanoma. La línea celular A357 además está tratada con el inhibidor de miARN-150.

miARN-21:

El siguiente estudio se realizó con el objetivo de investigar el papel de miARN-21 en el osteosarcoma, el tipo más común de cáncer de huesos. Para ello se usó la línea celular SAOS-2 y se le añadió un inhibidor de miARN-21. Se determinó la tasa de células apoptóticas por diferentes métodos y los resultados obtenidos mostraron que miARN-21 estaba sobreexpresado en tejidos con osteosarcoma, mientras que en el resto de las células controles no. En esta investigación se observó que la caspasa 8 era una diana

directa de miARN-21, que regulaba su expresión negativamente, obteniéndose una disminución de la apoptosis en dichas células (Figura 7) (Xu et al., 2017).

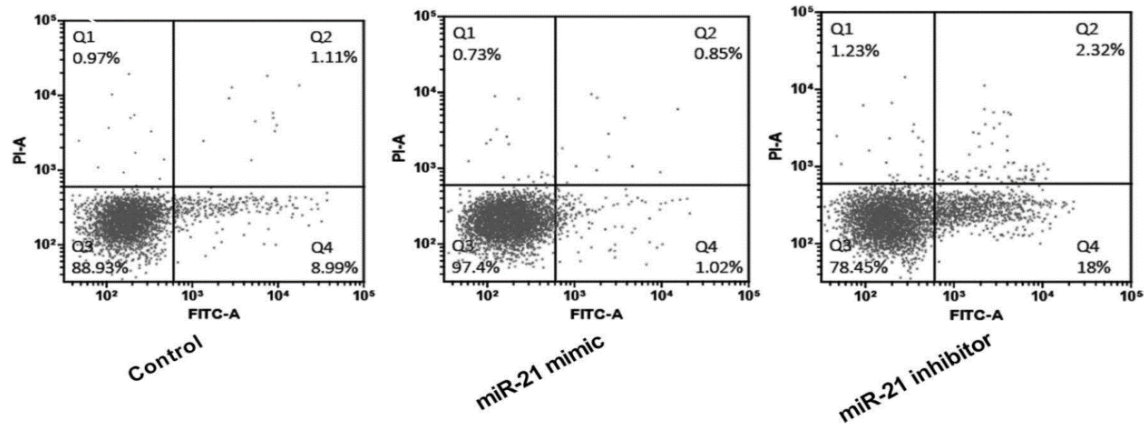


Figura 7. Una sobreexpresión de miARN-21, aumenta la supervivencia de la línea celular mientras que se inhibe la apoptosis.

miARN-130a:

En este caso el objetivo de este estudio fue identificar un miARN que pudiera servir como posible tratamiento terapéutico frente al cáncer de próstata resistente a taxanos. Para poder identificar los miARN apropiados y que tuvieran cierta relación con la resistencia a estos compuestos se hizo un perfil de miARNs usando células PC-3 de cáncer de próstata y tres líneas celulares resistentes a paclitaxel (taxano). Gracias a los diferentes métodos utilizados se halló un gen diana directo para miARN-130a. Los resultados obtenidos fueron que era capaz de activar la señalización apoptótica mediante la activación de la caspasa 8 y que la expresión de miARN-130a estaba reducida en todas las líneas celulares resistentes a paclitaxel, lo que podría estar directamente relacionado con su resistencia (Figura 8) (Fujita et al., 2015).

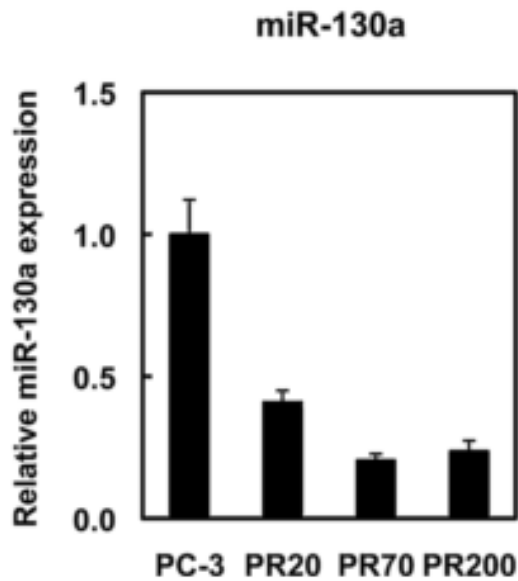


Figura 8. Comparación de la expresión del gen de miARN-130 en diferentes líneas celulares.

miARN-874:

Otra investigación se centró en los cardiomiocitos, debido que su muerte está implicada en importantes enfermedades de corazón como la insuficiencia cardiaca o el infarto de miocardio. Su objetivo era encontrar si existía algún miARN capaz de regular la necrosis. Los diferentes resultados obtenidos mostraron que miARN-874 era capaz de atenuar la necrosis en los modelos celulares. Además, se identificó que la caspasa 8 era la diana de dicho miARN, cuando se inhibía su expresión gracias a miARN-874, se perdía la capacidad necrótica. Finalmente consiguieron modular los niveles necróticos en el miocardio gracias a la regulación de miARN-874 y caspasa 8 (Figura 9) (Wang et al., 2013).

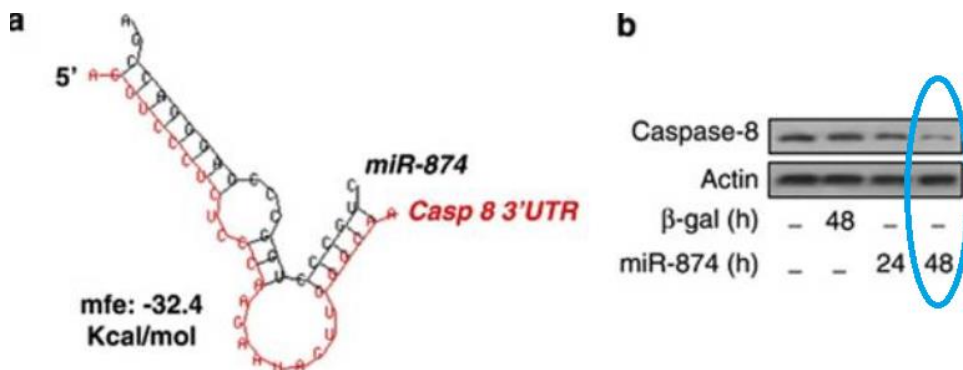


Figura 9. A) Hibridación de miARN-874 con la región 3'UTR de caspasa 8. B) Inmunoblot donde se muestra cómo miARN-874 suprime a las 48 horas la expresión de caspasa 8 en la línea celular.

miARN-122:

En otro estudio sobre la regulación de la muerte celular de cardiomiocitos en ratones, se aislaron estas células a partir de ratones neonatales y se les añadió un inhibidor de miARN-122. Los resultados mostraron que los niveles de caspasa 8 aumentaron por sobreexpresión de miARN-122 por lo que su disminución promovía la viabilidad celular e inhibía la apoptosis (Figura 10) (Zhang et al., 2017).

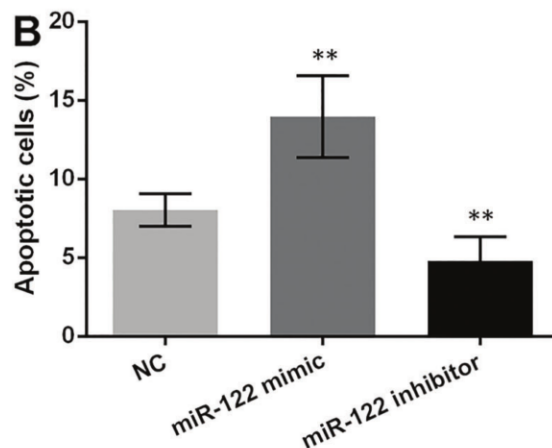


Figura 10. Porcentaje de células apoptóticas en líneas celulares de miocardiocitos de ratón que contienen: control negativo, línea celular con miARN-122 y línea celular con el propio inhibidor de miARN-122.

Los virus también pueden codificar miARN para proteger su propia supervivencia. Esto consiste en codificar un miARN capaz de inhibir a la caspasa 8, de esa manera evita la apoptosis celular pudiendo así aumentar su multiplicación y posteriormente propagación.

No obstante, también se llevó a cabo cierta investigación con camarones donde se realizó un estudio sobre miARN virales *in vivo* del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Los resultados obtenidos indicaron que la caspasa 8 era la diana del gen miARN viral WSSV-miARN-24, este gen reprimía la apoptosis de los hemocitos del camarón *in vivo*. Se encontró que la sobreexpresión de dicho gen condujo a una disminución significativa de los niveles de transcripción de la caspasa 8 tras 48h después de la infección. En cambio, el grupo control no tuvo ningún efecto sobre la expresión de la

caspasa 8 lo que indica que su ARN fue degradado específicamente por este miARN viral (Figura 11) (Huang et al., 2014).

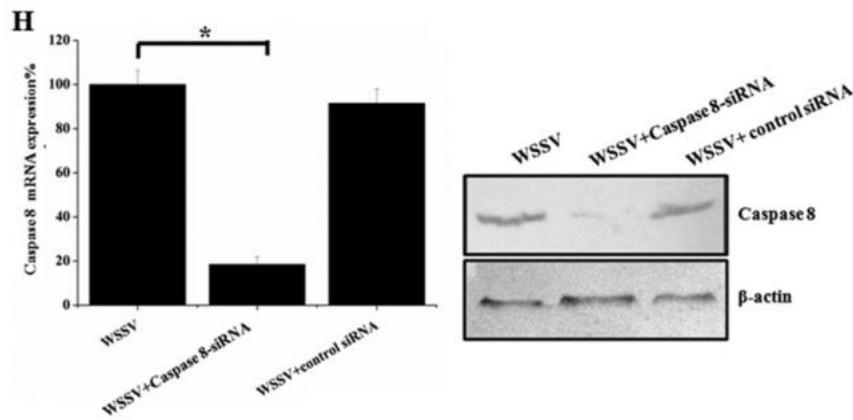


Figura 11. Hemocitos de camarón donde había tres grupos: WSSV, WSSV-caspasa 8 y WSSV-control-siARN. A las 48h se recogieron los hemocitos de camarón y se sometieron a PCR en tiempo real y transferencia Western.

Otros miARN virales que inhiben a la caspasa 8 son (Ver tabla 1) (Mocarski et al., 2012):

Inhibidor	Tipo de virus	Función
<u>vICA</u>	Citomegalovirus (CMV)	Previene activación
BORFE2	Herpes virus 4 bovino (BHV-4)	-
E· 14.7 <u>kDa</u>	Adenovirus	Previene activación
UL39	Virus Herpes Simple 1 (HSV-1), Virus Herpes Simple 2 (HSV-2)	Previene activación

Tabla 1: Diferentes tipos de miARN virales. Se desconoce la función de BORFE2.

El inconveniente de utilizar los miARNs como inhibidores de la caspasa 8, es que, al encontrarse en el propio organismo, son inhibidores inespecíficos, no solo inhiben a la caspasa en cuestión sino también a otras dianas. Se continúa investigando por esta línea, cómo a través de los miARN se puede llegar a alguna terapia frente importantes enfermedades, pero aún no se utilizó ninguno de ellos en clínica.

4.2.1.2. siARN sintéticos.

Los miARN sintéticos poseen la misma estructura y mecanismo de acción que los anteriores (micro ARN del propio organismo o virales) excepto que la mayoría actúan en el proceso de traducción a nivel de degradación de proteínas.

Existen principalmente dos tipos de miARN sintéticos, por un lado, shARN, el cual se encuentra en forma de horquilla, con una doble cadena; y por otro lado, siARN, formado por una doble cadena complementaria y sin horquilla. Podría decirse que shARN es un precursor, procesado en el citoplasma por DICER (complejo enzimático explicado anteriormente en el silenciamiento genético) que se encarga de romper de forma selectiva las moléculas de ARN de doble cadena hasta formarse el siARN. Posteriormente, los siARN formados se incorporan al complejo enzimático conocido como RISC, anteriormente citado en el silenciamiento genético, donde los ARN se unen por complementariedad y el siARN guía a dicho complejo enzimático para que lleve a cabo la ruptura del ARNm. Esta ruptura del ARN la realizan unas proteínas asociadas a este complejo citadas también anteriormente y conocidas como argonautas (Figura 12) (Noriega et al., 2016).

Se pueden utilizar tanto el shARN como siARN, los dos generan un silenciamiento potente pero su efecto es transitorio. Los siARN son sintetizados principalmente para la delección de un gen específico, para ello se realizan algunas modificaciones químicas, al no tener que procesarse a través del DICER, facilitan la activación del complejo proteico RISC, por lo que los siARN a menor concentración dan lugar a una respuesta más potente.

Esta técnica ha sido utilizada como terapia génica para aplicaciones relacionadas con la degeneración macular debida a la edad, infecciones virales como hepatitis, virus del VIH, y se encuentra en investigación su uso frente a enfermedades neurodegenerativas o incluso el cáncer (Kim and Rossi 2009).

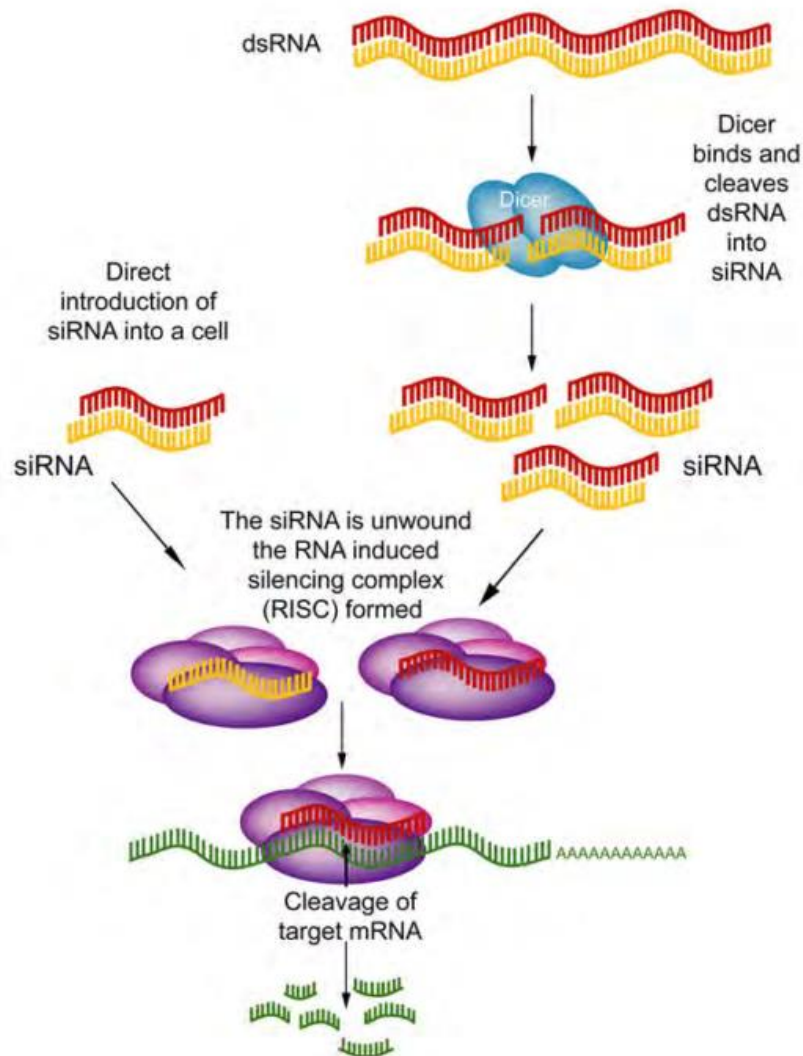


Figura 12. Mecanismo de actuación de shARN y siARN.

A continuación, se muestra una tabla comparativa de las diferencias más notables que existen entre los miARN que forman parte del propio organismo y los siARN sintéticos. Donde algunas de las diferencias más significativas son que los miRNA pertenecen al propio organismo, son monocatenarios, no son específicos, regulan genes distintos a los que expresan, actúan en cualquier etapa del proceso de translación y su principal función es regular genes. En cambio, los siARN, son de doble cadena, son específicos, regulan los mismos genes que expresan y su principal función es degradar ARNm (Tabla 2) (Jurj et al., 2017).

	miARN	siARN
Incidencia	Ocurre naturalmente en plantas y animales	Ocurre naturalmente en plantas y animales inferiores. En mamífero aun es una pregunta sin resolver
Configuración complementariedad al ARNm	Cadena simple	Cadena doble
Longitud	19-25 nucleótidos	21-22 nucleótidos
Complementariedad al ARNm	No es específico y por tanto un único miARN puede hibridarse con cientos de ARNm	Complementariedad perfecta, los siARNs si destruyen a genes específicamente con algunas excepciones
Biogénesis	Expresado por genes cuyo objetivo es la síntesis de miARN, pero regulan genes diferentes a los que son expresados	Regulan los mismos genes que expresan
Acción	Inhibe la traducción de ARNm	Escinden ARNm
Función	Reguladores de genes	Actúan como guardianes del silenciamiento genético en plantas y animales que no tienen inmunidad mediada por anticuerpo o células
Uso clínico	Posible uso terapéutico ya sea como diana farmacológica o como agentes farmacológicos. Los niveles de expresión de miARN pueden usarse como posibles herramientas de diagnóstico y biomarcadores	Los siARNs son valiosas herramientas de laboratorio utilizadas principalmente para destruir genes en biología molecular. SiARN se usan en ensayos clínicos como posibles agentes terapéuticos

Tabla 2. Diferencias entre miARN y siARN.

4.3. RATONES KO.

Los ratones knockout (ratones KO), fueron desarrollados por primera vez gracias a tres investigadores, Mario Capecchi, Martin Evans y Oliver Smithies entre los años 1987 y 1989. Gracias a esta investigación obtuvieron el Premio Nobel de Medicina en el año 2007. Estos ratones se caracterizan por tener uno o más genes deletados, es decir inactivados. Esta idea surgió con el propósito de comprender la función del gen que se deleta y así estudiar enfermedades como la arterosclerosis, el cáncer, la fibrosis quística o el Parkinson entre otros. Esta tecnología también ha facilitado la comprensión de procesos biológicos normales como el del sistema nervioso o el desarrollo del sistema inmune. Para ello se estudia la diferencia que existen entre los ratones modificados y ratones normales y así los investigadores pueden obtener una conclusión de los diferentes estudios (De La Paz 2008).

La técnica más reciente y usada hoy en día es CRISPR (Repeticiones Palindrónicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas). Esta técnica fue descubierta en 1963 por primera vez por un español llamado Francisco Mojica, pero fue posteriormente en el año 2015 cuando la estadounidense Jennifer Doudna y la francesa Emmanuelle Charpentier se llevaron el premio Princesa de Asturias de Investigación por desarrollar esta tecnología.

CRISPR son secuencias de ADN bacteriano que contienen ADN de virus que anteriormente han atacado a dichas bacterias. Estas repeticiones palindrónicas son utilizadas por la bacteria para poder defenderse de virus similares de los que adquirieron esa secuencia. Asociado a estas secuencias CRISPR se encuentra unido CAS9 que es otro gen con acción endonucleasa, que le aporta a la bacteria una inmunidad adquirida. (Pennisi, 2013)

Las secuencias espaciadoras que contiene CRISPR son las que se encargan de guiar a las endonucleasas CAS9 para eliminar las secuencias complementarias (Marraffini, Sontheimer, 2011).

De forma más detallada, esta técnica consiste en añadir a una célula embrionaria el complejo formado por CRISPR y CAS9, junto con los ARN guías, que son ARN interferentes complementarios al gen que queremos destruir. Este complejo actúa

como unas tijeras cortando el gen que deseamos deletar dando lugar a introducción de mutaciones o la eliminación del propio gen. De esta forma cuando se desarrollen los embriones y nazcan tendrán deletado los genes seleccionados (Esvelt et al., 2014).

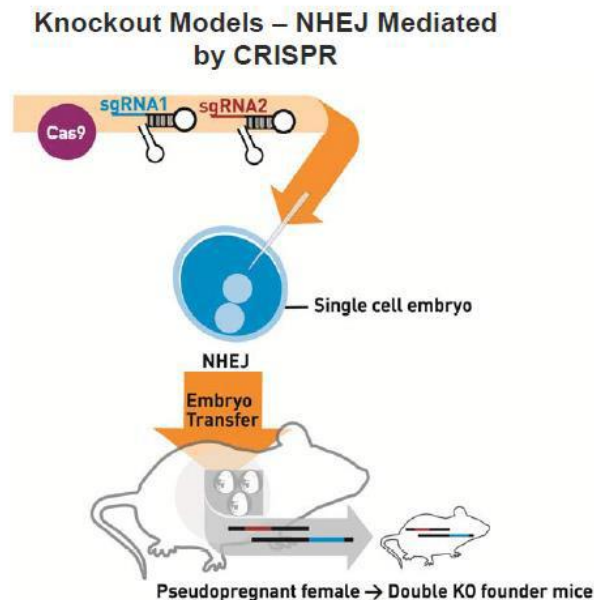


Figura 13. Mecanismo de acción del complejo enzimático CRISPR/CAS9.

Ciertos genes son imprescindibles a la hora del desarrollo embrionario por lo que la delección puede ser constitutiva o inducible. Si es de tipo inducible, se suelen utilizar hormonas, como por ejemplo el tamoxifeno o ciertos derivados. Se inyecta una vez el ratón es adulto, activan al complejo enzimático y se lleva a cabo la delección del gen. Existen ciertos inconvenientes al utilizar el tamoxifeno, ya que al ser una hormona pueden afectar a otras vías de señalización y alterar los resultados (Weinlich et al., 2013).

En el caso de eliminar el gen que codifica la caspasa 8, es inviable para los ratones dado que conduce a la letalidad embrionaria e incluso en ratones recién nacidos a los 10 días y medio, también sufren la muerte debido a deformaciones cardíacas o defectos del tubo neural, es decir que esta proteína tiene un papel importante en la homeostasis adulta (Kang et al., 2004). Esto se debe a que al inactivar la vía apoptótica se activa la necroptosis. Por lo tanto, una solución hallada a este problema fue generar ratones dobles KO los cuales tenían inactivada tanto la vía apoptótica como la necroptótica al

haber delecionando el gen de la caspasa 8 y RIPK3 respectivamente. Estos ratones sobrevivían sin ningún problema excepto que tenían el bazo de mayor tamaño al no eliminarse las células del sistema inmune (Dillon et al., 2012).

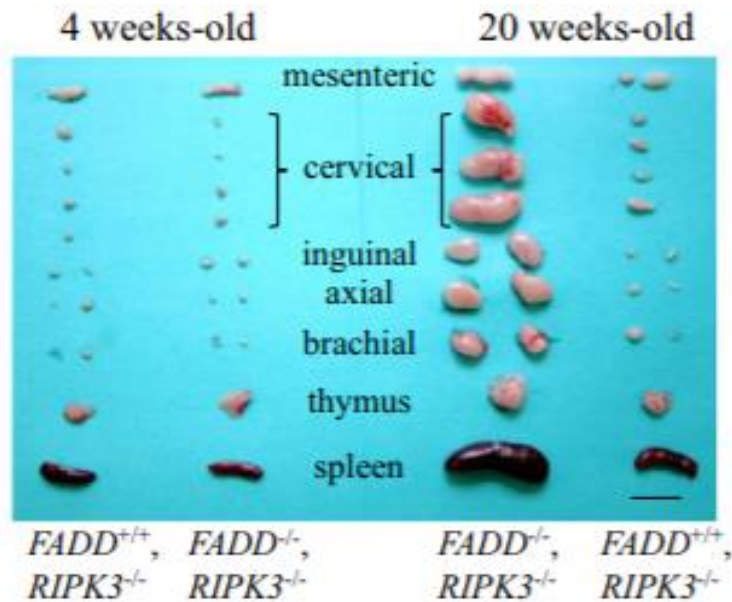


Figura 15. Órganos linfoides de ratones a las 4 semanas y 20 semanas.

En otros estudios también se comprobó que la caspasa 8 desempeña un papel apoptótico en hepatocitos protegiendo a la célula de la toxicidad producida por el ligando FAS, que son necesarias para el funcionamiento hematopoyético o incluso que esta relacionando con la defensa inmune, participando en la diferenciación de macrófagos inducida por el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (Kang et al., 2004).

Es importante la elección del tipo de célula en el que se llevará a cabo a la eliminación del gen que codifica a la caspasa 8 junto con la pérdida aguda de cFLIP. En el caso de llevarse a cabo en células epiteliales se producen úlceras con hiperplasia epidérmica e hiperqueratosis superficial entre otros daños debido a que la caspasa 8 es necesaria para el mantenimiento homeostático de la piel en animales adultos (Weinlich et al., 2013).

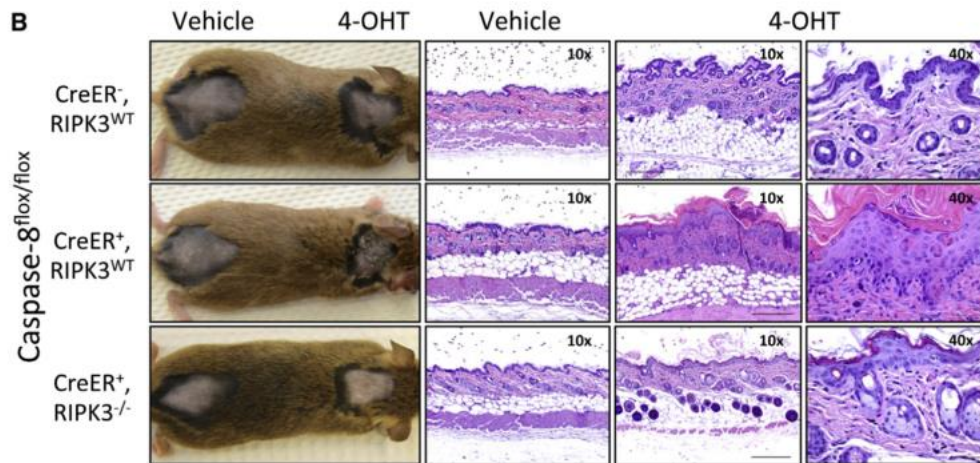


Figura 14. La eliminación de caspasa 8 en células epiteliales dio lugar a una gran ulceración con hiperplasia epidérmica e hiperqueratosis. Además, también se formó pústulas centrales, edema e infiltración de células inmunes.

4.4. INHIBIDORES SINTÉTICOS.

Los inhibidores sintéticos de la caspasa 8 se han desarrollado en investigación y algunos se han aplicado posteriormente en clínica para la mejora de muchas enfermedades. La caspasa 8 se puede controlar positivamente a través de señalizaciones celulares que dan lugar a la activación del zimógeno o en sentido negativo mediante inhibidores que evitan que lleguen a sus sustratos.

El dominio Ring C-terminal de la caspasa 8 permite que se degrade vía apoptosoma al ser ubiquitinada, impidiendo así su dimerización y con ello la actividad enzimática de la misma (Callus and Vaux 2007) (Linkermann and Brasen 2012).

El inhibidor sintético químicamente por excelencia es el conocido como z-IETD-FMK (Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp-(OMe)-FMK) (Figura 15) (González-García 2000), que inhibe de forma específica a la caspasa 8, pero no de forma tan eficiente como los inhibidores pancaspasa (Q-VD-OPh y z-VAD-FMK), que van a inhibir a otras caspasas además de la caspasa 8 (McStay et al., 2008). A continuación, expondremos cuáles son las modificaciones sobre la propia molécula que se pueden llevar a cabo para aumentar su potencia.

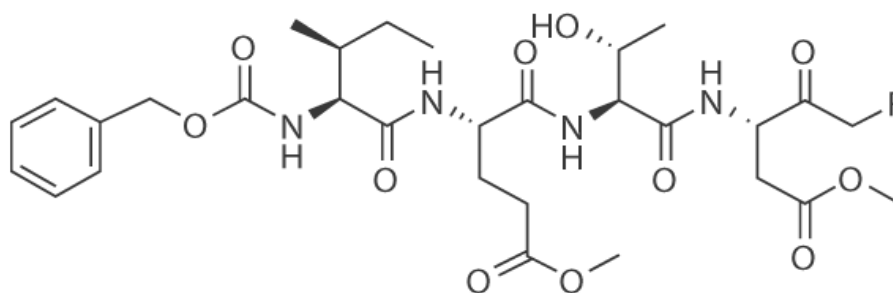


Figura 15. Estructura del inhibidor z-IETD-FMK.

El grupo O-fenoxi-carboxil (OPh) terminal hace que el inhibidor sintetizado sea más reactivo con la cisteína de la caspasa 8 en comparación con los grupos fluorometilcetonas (FMK). Además, el grupo quinolilo (Q) amino terminal hace que aumente la permeabilidad celular al inhibidor, por lo que con una concentración menor se consigue mayor o igual efecto (Callus and Vaux 2007).

Por otro lado, el grupo ácido fenilacético (z o cbz) unido a diferentes inhibidores de la caspasa 8 podría ser tóxico para la célula. Por ejemplo, el grupo z unido al inhibidor CMK es tóxico, en cambio cuando este grupo va unido a los inhibidores FMA o DMK no. Inicialmente se postuló que el grupo FMK sería un inhibidor reversible para serin proteasas, pero una vez sintetizado se descubrió que era irreversible y que se podía modular para que fuera específico de cisteín proteasas.

Cuando se estudió el inhibidor de catepsina B, z-FA-CMK en células Jurkat T se vio que inhibía la muerte celular apoptótica, pero a altas concentraciones las células morían por necrosis debido a su toxicidad. Además de que la toxicidad es exclusiva del grupo CMK cuando va junto al grupo z en la parte N-terminal, al tener un aminoácido de alanina en posición 1 aumentaba su toxicidad. Se comprobó que sustituyendo la alanina por otro grupo como la fenilalanina es decir z-FF-CMK además de que aumentaba la afinidad del inhibidor por la enzima y disminuía la toxicidad debido a la ausencia de la alanina en posición 1 (Liow and Chow 2013).

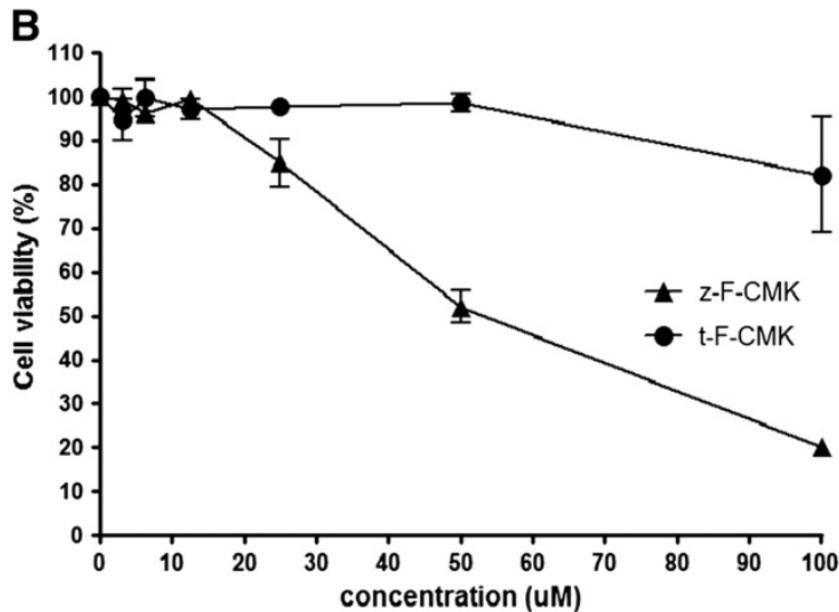


Figura 16. Papel del grupo ácido fenilacético (z) N-terminal en la toxicidad de z-FA-CMK. Las células Jurkat T se trataron con diversas concentraciones de CMK peptídico y la viabilidad celular se determinó después de 6 h.

El inhibidor citado anteriormente z-IETD-FMK contiene grupos metilos en los aminoácidos ácidos, ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D) para aumentar la permeabilidad celular, que posteriormente son eliminados mediante las esterasas celulares (Yang et al., 2003).

Alternativamente también se encuentra disponibles inhibidores que utilizan leucina (Leu) en lugar de isoleucina (Ile) con propiedades muy similares.

Otra alternativa para mejorar la selectividad y potencia del inhibidor consiste en estudiar la propia selectividad de los sustratos de la caspasa 8, para así poder crear inhibidores más selectivos y específicos. Se descubrió que había sitios de unión comunes en todas las caspasas, por lo tanto, se estudió cuáles eran los sustratos más selectivos para cada posición y la propia diferencia entre ellos.

Por ejemplo, la posición 4 es la más característica en la familia de las caspasas y la que se encarga de discriminar la selectividad del sustrato. La caspasa 8 no tolera los grupos básicos en esta posición mientras que los grupos alifáticos están altamente favorecidos. En cambio, la posición 3 es la menos discriminatoria. En cuanto a la posición 2 es importante ya que es la que nos permite distinguir la homología existente entre la caspasa 10 y 8, debido a que la caspasa 10 es capaz de reconocer aminoácidos grandes

e hidrofóbicos, así como también aminoácidos pequeños y básicos, en cambio la caspasa 8 no.

Un análisis específico de los sustratos de la caspasa 8 reveló que el sustrato más activo contiene tert-leucina en la posición 4, ácido homoglutámico en la posición 3 y treonina éster de bencilo en la posición 2 (Ver tabla 3) (Liow and Chow 2013).

	Casp-3	Casp-6	Casp-7	Casp-8	Casp-9	Casp-10
<i>P4 position</i>						
Asp	•••••	•	•••••	••	•	•
Asp esters	•	•	•••	•••••	•	•
Ile, Leu, Val	•	•••••	•	•••••	•••••	•••••
Abu, hLeu, Nva, Tle	•	•••••	•	•••••	•••••	•••••
Hyp, Thz, Hyp(Bzl), Oic	•	•	••	•••	•••••	•
D-hPhe, D-Phg	•	•	•	•••	•••••	•
dhLeu, dhAbu	•	•	•	•••	••	•
Phe(2-Cl)	•	••	•	•••	••	•••
Others	•	•	•	•	•	•
<i>P3 position</i>						
Glu	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••
Glu esters	•••	•••	•••	•••	•••	•••
hGlu	•••	••	•••	•••••	•••	•••
Val, Tle	••	•	•••••	••	•••••	••
D-amino acids	•	•	•	•	•	•
Phe-derivatives	•••	•	••	•	•	•
Bulky amino acids	••	••	•••	••	••	••
Basic amino acids	••	•	•••	•	••	••
Small, hydrophobic	••	•	••	••	••	••
<i>P2 position</i>						
Thr(Bzl)	•••••	•••••	•••••	•••••	•	••
Val, Ile	•••	••	••	••	•	••
Oic, Pip, Tic	••	•	••	••	•	•••••
His, His(Bzl)	•	•••••	•	••	•••••	•••••
Ser(Bzl), hPhe, hTyr	•	•••	•	••	•	•••••
D-amino acids	•	•	•	•	•	•
Others	•	•	•	•	•	•••

Tabla 3. Resultados de la actividad enzimática dependiendo de la especificidad de los diferentes sustratos a los distintos tipos de caspasa 8.

Por lo que como conclusión podemos dividir a la caspasa 8 en 3 regiones conocidas como: posición 4, del extremo amino; la posición 2 y 3, región del dipéptido, y la posición 1, conocida como cabeza nuclear (Figura 16) (Poreba et al., 2013).

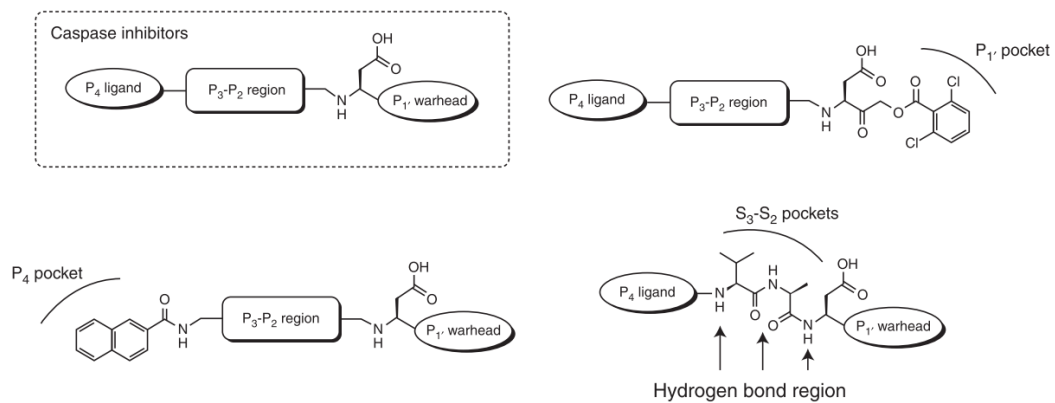


Figura 17. Descripción general de la estructura de un inhibidor de caspasa.

Estos cambios hicieron que mejorara las tasas catalíticas de hidrolisis peptídicas. Aun sabiendo estos datos los sustratos de caspasa comúnmente usados son aquellos que sólo contienen aminoácidos naturales que son menos selectivos (Figura17) (Poreba et al., 2014).

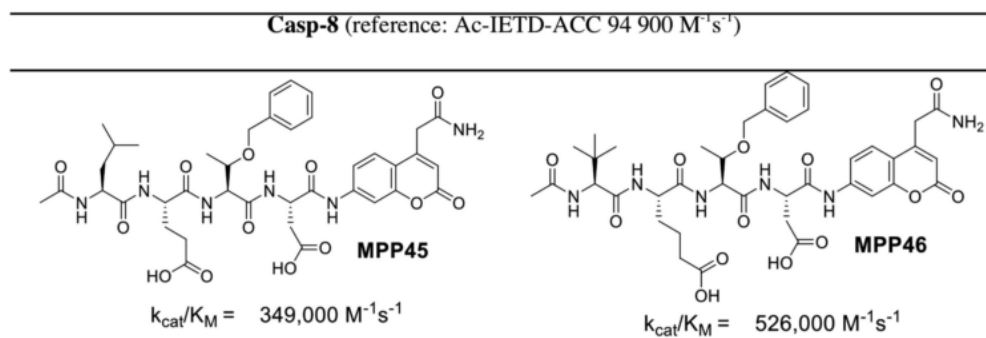


Figura 18. Ejemplo de nuevos sustratos de caspasa altamente sensibles que contienen aminoácidos no naturales.

El primer fármaco inhibidor de caspasa que se encuentra en ensayos clínicos es el conocido como Emricasan desarrollado por Idun Pharmaceuticals cuya patente pertenece actualmente al laboratorio Novartis (Figura 18).

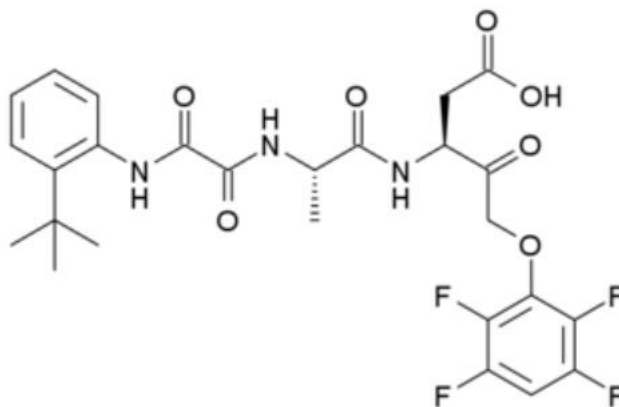


Figura 19. Estructura molecular Emricasan.

Este fármaco es un inhibidor del tipo pancaspasa irreversible utilizado como antiapoptótico y antiinflamatorio. Su principal aplicación sería para tratamiento frente a la cirrosis por esteatosis no alcohólica, aunque también se está investigando su acción antiviral y anticancerosa (Figura 19) (Spada et al., 2015).

Program	Disease Area	Indication	Early Preclinical	Lead Selection	IND Enabling	Phase 1	Phase 2	
Emricasan*	Liver	POLT	POLT-HCV-SVR				April 2018✓	
	Liver	NASH Cirrhosis	ENCORE-PH				Data 2H18	
	Liver	NASH Fibrosis	ENCORE-NF				Data 1H19	
	Liver	NASH Cirrhosis	ENCORE-LF				Data 2H19	
IDN-7314	Liver	PSC (Primary Sclerosing Cholangitis)						
Pan-caspase Inhibitor	GI							
Selective Caspase Inhibitor	Lung							

Figura 20. Estado en el que se encuentra el estudio de ensayo clínico del fármaco Emricasan y otros posibles fármacos inhibidores de caspasas que se encuentran en investigación.

En este trabajo hemos presentado los diferentes tipos de inhibidores que existen de la caspasa 8, sus características principales, así como sus ventajas y limitaciones (Tabla 4). Por un lado, el uso de animales KO para caspasa 8 implica la ausencia física de la enzima y con ello de su actividad enzimática. En el caso particular de la caspasa 8 estos animales no son viables, por lo que se hace necesaria la delección inducible con tamoxifeno una vez que son adultos, o el uso de dobles KO para caspasa 8 y RIPK3 que previenen la muerte celular por apoptosis y necroptosis. Esto conlleva que se vea alterada la expresión y actividad de otros genes además de la caspasa 8, o la aparición de rutas compensatorias, provocando que los resultados obtenidos puedan quedar enmascarados parcialmente o no se puedan atribuir enteramente a la caspasa 8.

De manera similar, los miARN, shARN y siARN, inhiben la expresión de la caspasa 8. Sin embargo, a diferencia de las células KO para caspasa 8, la inhibición en estos casos es del 90% en la mejor de las circunstancias, quedando por tanto una actividad residual que puede afectar al resultado final de los experimentos, al ser suficiente para la supervivencia o activación celular. Además, a diferencia de los KO, donde la delección es permanente, aquí la inhibición es transitoria y reversible, durando de media unas 48-72

horas. Por último, suelen presentar efectos “off-target” que pueden inhibir otras dianas desconocidas de forma inespecífica. Sin embargo, al contrario de los animales KO, son mucho más baratos de sintetizar, y por tanto más asequibles para los laboratorios de investigación.

Por último, los inhibidores sintéticos derivados de péptidos únicamente inhiben la actividad enzimática de la caspasa 8, pero ni delecionan ni afectan a su estructura, por lo que la presencia del esqueleto proteico de la enzima puede seguir formando parte de las vías de señalización celular. Además, pueden ser reversibles o irreversibles dependiendo de si la unión es covalente o no, y específicos de la caspasa 8 o inhibir otras caspasas simultáneamente, siendo el inhibidor z-IETD-FMK el más usado. Independientemente de que sean específicos de caspasa 8 o pancaspasa, distan bastante de inhibir únicamente a la caspasa 8, por lo que los resultados deben ser considerados con precaución antes de sacar conclusiones.

En definitiva, según se use un tipo u otro de inhibidor, los efectos podrán atribuirse a la actividad enzimática de la caspasa 8 o a su mera presencia física, podrán ser temporales o permanentes, y provocar una inhibición total o parcial. En este sentido, la literatura científica ofrece resultados dispares según se usen unos u otros, por ello es necesario que los trabajos no se limiten a un único tipo de inhibición, sino que incorporen varias estrategias para maximizar la información obtenida y la fiabilidad de sus conclusiones.

	VENTAJAS	LIMITACIONES
miARN	Todo tipo de organismo	Mutación reversible e incompleta
Ratones KO	Permanente	Letalidad Costoso
Inhibidores sintéticos	Gran variabilidad: reversibles, irreversibles	Especificidad

Tabla 4. Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de inhibidores.

5. CONCLUSIONES.

La caspasa 8 es una enzima muy importante de los organismos. No sólo está implicada en procesos de muerte celular, sino en procesos de supervivencia celular o respuesta inmune. La inhibición de su actividad enzimática es una labor muy compleja debido a que está implicada en muchas vías de señalización celular.

Se han investigado diferentes tipos de inhibidores y algunos de ellos incluso se están probando en estudios clínicos, pero aún no se ha encontrado el inhibidor perfecto para esta enzima, por lo que es un tema que actualmente se encuentra en estudio e investigación.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Callus BA, Vaux DL. Caspase inhibitors: Viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):73–8.
- Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature.* 2002;419(6905):395–9.
- Dillon CP, Oberst A, Weinlich R, Janke LJ, Ben-moshe T, Mak TW, et al. *Cell Rep.* 2012;1(5):401–7.
- Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspasas: Moléculas Inductoras de Apoptosis. *Gac Med Mex.* 2003;139(5):493–9.
- Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife.* 2014;3(July2014):1–21.
- Fujita Y, Kojima T, Kawakami K, Mizutani K, Kato T, Deguchi T, et al. MIR-130a activates apoptotic signaling through activation of caspase-8 in taxane-resistant prostate cancer cells. *Prostate.* 2015;75(14):1568–78.
- García Martínez JM. Mecanismos intracelulares de supervivencia y muerte neuronal en modelos excitotóxicos y transgénicos de la enfermedad de Huntington. 2007;203p.
- González-García C. Cisteína proteasas y neurodegeneración. *Rev Neurol.* 2000;31(4):333–40.
- Huang T, Cui Y, Zhang X, Ross SR. Involvement of Viral MicroRNA in the Regulation of Antiviral Apoptosis in Shrimp. *J Virol.* 2014;88(5):2544–54.
- Irachela A. El suicidio y la muerte celular. *Rev Real Acad Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* 2007;101(2):1–33.
- Jurj A, Braicu C, Pop LA, Tomuleasa C, Gherman CD, Berindan-Neagoe I. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:2871–90.
- Kang T-B, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogev N, Jurewicz A, et al. Caspase-8 Serves Both Apoptotic and Nonapoptotic Roles. *J Immunol.* 2004;173(5):2976–84.

- Keller N, Grütter MG, Zerbe O. Studies of the molecular mechanism of caspase-8 activation by solution NMR. *Cell Death Differ.* 2010;17(4):710–8.
- Kim DH, Rossi JJ. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* 2009;44(5):613–6.
- De La Paz JMM. Ratones knockout. *Gastroenterol y Hepatol Contin.* 2008;7(1):42–6.
- Linkermann A, Brasen J. Dichotomy between RIP1- and RIP3-Mediated Necroptosis in Tumor Necrosis Factor- α -Induced Shock. *Molecular Medicine.* 2012;18(4):1.
- Liow KY, Chow SC. The cathepsin B inhibitor, z-FA-CMK is toxic and readily induced cell death in human T lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(3):559–67.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. Nature reviews. *Genetics.* 2011;11(3):181-90.
- McStay GP, Salvesen GS, Green DR. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: Implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* 2008;15(2):322–31.
- Mocarski ES, Upton JW, Kaiser WJ. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):79–88.
- Noriega D, Valencia A, Villegas B. Arn de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga rna intereference (RNAi): a novel technology with potential for pest insect management. *udca act div cient.* 2016;4(191):25–35.
- Poreba M, Kasperkiewicz P, Snipas SJ, Fasci D, Salvesen GS, Drag M. Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2014;21(9):1482–92.
- Poreba M, Strózyk A, Salvesen GS, Drag M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(8).
- Pennisi E. The CRISPR Craze. *Science.* 2013;341(6148):833–6.
- Spada AP, Contreras PC, Huyghe MC, Morris M, Burgess GC, Idn- E. Emricasan , a potent pan-caspase inhibitor , rapidly reduces caspase activity and

biomarkers of apoptosis in patients with hepatic impairment but not in healthy volunteers : implications for safety , selectivity and mechanism of action. Poster presented at EASL April 2015.

- Wan J, Yang J, Huang Y, Deng L. MicroRNA-150 inhibitors enhance cell apoptosis of melanoma by targeting PDCD4. *Oncol Lett.* 2018;15(2):1475–82.
- Wang K, Liu F, Zhou LY, Ding SL, Long B, Liu CY, et al. MiR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell Death Dis.* 2013;4(7):1–10.
- Weinlich R, Oberst A, Dillon CP, Janke LJ, Milasta S, Lukens JR, et al. Protective Roles for Caspase-8 and cFLIP in Adult Homeostasis. *Cell Rep.* 2013;5(2):340–8.
- Xu B, Xia H, Cao J, Wang Z, Yang Y, Lin Y. MicroRNA-21 Inhibits the Apoptosis of Osteosarcoma Cell Line SAOS-2 via Targeting Caspase 8. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther.* 2017;25(7):1161–8.
- Yang W, Guastella J, Huang JC, Wang Y, Zhang L, Xue D, et al. MX1013, a dipeptide caspase inhibitor with potent in vivo antiapoptotic activity. *Br J Pharmacol.* 2003;140(2):402–12.
- Zhang ZW, Li H, Chen SS, Li Y, Cui ZY, Ma J. MicroRNA-122 regulates caspase-8 and promotes the apoptosis of mouse cardiomyocytes. *Brazilian J Med Biol Res.* 2017;50(2):8–13.
- Biotecnología microbiana . Silenciamiento genético mediado por RNA en hongos : mecanismos y aplicaciones. 2017;9:151–73.
- Galluzzi L, Pedro JMB, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death. 2015;58–73.