



**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**“MONOGRAFÍA”**

**“TERAPIA GÉNICA CON RNA DE INTERFERENCIA”**

**PRESENTA:  
ROSARIO ANDREA MORALES SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DEL TRABAJO RECEPCIONAL:  
DR. MARIO ROBERTO BERNABÉ GUAPILLO VARGAS**

**ORIZABA, VER.**

**ENERO, 2010**

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>Lista de abreviaturas.</b>	<b>I</b>
<b>Resumen.</b>	<b>III</b>
<b>Introducción.</b>	<b>IV</b>
<b>Justificación.</b>	<b>V</b>
<b>Objetivos generales y particulares.</b>	<b>VI</b>
<b>Capítulo I: Desarrollo del RNA de interferencia como terapia génica.</b>	<b>1</b>
1.1. <b>Estructura de los ácidos nucleicos.</b>	<b>1</b>
1.2. <b>Transcripción de genes codificadores de proteínas.</b>	<b>3</b>
1.2.1. La RNA polimerasa transcribe una hebra molde de DNA para formar una hebra complementaria de RNA.	<b>3</b>
1.3. <b>Etapas de la transcripción.</b>	<b>5</b>
1.4. <b>Las tres funciones del RNA en la traducción.</b>	<b>7</b>
1.4.1. Expresión génica.	<b>9</b>
1.5. <b>Terapia génica.</b>	<b>10</b>
1.5.1. Clasificación.	<b>11</b>
1.5.2. Terapia antisentido.	<b>13</b>
1.6 <b>Desarrollo del RNAi de interferencia como inhibidor de expresión de genes.</b>	<b>13</b>
1.6.1. Mecanismo del RNAi.	<b>14</b>
1.6.2. siRNAs	<b>15</b>

1.6.3. RISC	17
1.6.2. Remodelación de la cromatina.	20
1.6.3. Ensamble de miRNA.	21
<b>1.7. Degradación del RNAm y represión traduccional por miRNA.</b>	22
<b>1.8. Liberación de siRNAs en células blanco y efectos secundarios.</b>	23
<b>1.9. Resumen de definiciones.</b>	26
<b>1.10. Complicaciones comunes en el uso de RNAi.</b>	28
<b>1.11. La ruta del RNAi en la genética de mamíferos.</b>	31
1.11.1. El RNAi como una herramienta de análisis genómico global.	33
<b>1.12. RNAi en el tratamiento y descubrimiento de nuevos fármacos.</b>	34
<b>1.13. Estrategias para el uso efectivo del RNAi.</b>	35
<b>Capítulo II: usos del RNAi en la terapia génica.</b>	36
<b>2.1. Enfermedades genéticas.</b>	36
2.1.1. Esclerosis lateral amiotrófica.	37
2.1.2. Enfermedad de parkinson.	39
2.1.3. Enfermedad de huntington.	40
2.1.4. Ataxia espinocerebelar tipo I.	42
2.1.5. Ataxia espinocerebelar tipo III.	43
2.1.6. Alzheimer.	43
<b>2.2. Enfermedades metabólicas.</b>	44
<b>2.3. Enfermedades virales.</b>	45
2.3.1. Mecanismos de contradefensa de los virus.	46

2.3.2. RNAi para terapia en VHB.	47
2.3.3. RNAi para terapia en VIH.	48
<b>2.4. Cáncer.</b>	<b>51</b>
2.4.1. Cáncer de mama.	52
2.4.2. Cáncer de pulmón.	53
2.4.3. Cáncer de próstata.	54
2.4.4. miRNA y la apoptosis.	54
2.4.5 siRNAs en cáncer.	55
<b>2.5 Fármacos para el tratamiento de patologías oculares.</b>	<b>55</b>
<b>Anexos.</b>	<b>58</b>
<b>Referencias.</b>	<b>61</b>
<b>Referencias de figuras.</b>	<b>64</b>
<b>Referencias de tablas.</b>	<b>64</b>
<b>Referencias de anexos.</b>	<b>64</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS.**

<b>A</b>	Adenina.
<b>Apo B</b>	Apolipoproteína B.
<b>AUG</b>	Secuencia Adenina, Uracilo, Guanina.
<b>CAG</b>	Secuencia Citosina, Adenina, Guanina.
<b>C</b>	Citosina.
<b>CCR5</b>	Receptor celular.
<b>CHC</b>	Carcinoma hepatocelular.
<b>Chp1</b>	Proteína asociada a heterocromatina.
<b>CYLD</b>	Gen de susceptibilidad a cilindromatosis.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>dsRNA</b>	RNA de doble cadena
<b>G</b>	Guanina.
<b>HD</b>	Huntington disease.
<b>htt</b>	Gen humano que codifica huntingtina.
<b>kb</b>	1000 pb.
<b>miRNA</b>	MicroRNA.
<b>miRNP</b>	Complejo ribonucleoproteico de miRNA.
<b>PAZ</b>	Dominios PIWI/Argonauta/ZWILLE.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
<b>PEPCK</b>	Enzima que controla la glucogénesis.
<b>PP<sub>i</sub></b>	Pirofosfato.
<b>RISC</b>	RNA inducing silencing complex
<b>RITS</b>	Complejo iniciador del silenciamiento génico transcripcional.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>RNAhp</b>	RNA en horquillas pequeñas.
<b>RNAi</b>	RNA de interferencia.
<b>RNAip</b>	RNA de interferencia pequeños.
<b>RNAm</b>	RNA mensajero.
<b>RNAr</b>	RNA ribosomal.
<b>RNAt</b>	RNA de transferencia.
<b>rNTP</b>	Ribonucleótido trifosfato.
<b>siRNA</b>	RNA de doble cadena interferentes cortos.
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido.
<b>stRNA</b>	Pequeños RNA temporales.

**T**

Timina

**U**

Uracilo

**VHB**

Virus de la Hepatitis B.

**VIH**

Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

## **RESUMEN.**

El silenciamiento génico vía interferencia de ARN (ARNi), es una de las técnicas experimentales más utilizadas de los últimos años. En el área de la biología, el hecho de que las moléculas de ARN puedan regular la expresión de genes es sin duda el hallazgo más importante en décadas. La razón de su éxito se debe a que es un mecanismo biológico conservado que se encuentra presente en las células de una gran cantidad de organismos, incluido el humano.

El RNA de interferencia es una conservada respuesta biológica a la presencia de RNA de doble cadena, lo cual origina el silenciamiento específico de secuencia de un gen determinado. El esfuerzo exhaustivo en la investigación durante los últimos 5 años ha facilitado la colocación acelerada del RNAi de un fenómeno biológico desconocido a una herramienta valiosa utilizada en el silenciamiento de la expresión genética y en monitoreos genómicos funcionales a gran escala. Con esta tecnología, trabajos recientes han demostrado éxito en el potencial terapéutico del RNAi para tratar diversas enfermedades. Sin embargo para incrementar estas aplicaciones y la aplicación en el futuro del RNAi tanto en la investigación básica como el tratamiento de desórdenes causados en aberraciones genéticas, es importante poseer un entendimiento del proceso del RNAi.

## INTRODUCCIÓN.

El RNA de interferencia ha emergido como un mecanismo natural para detener la expresión genética.

El descubrimiento del RNAi (RNA de interferencia) comenzó con el silenciamiento de genes descrito en plantas en 1990 por el grupo de Rich Jorgensen, intentando aumentar el color púrpura de petunias por introducción de un gen clonado que producía un pigmento. Se observó que cuando se introducía en la planta una copia extra del gen que codifica para la enzima que participa en la producción de pigmentos, las flores resultantes tenían colores variados, desde púrpura a blanquecino.

En 1998, Fire y Mello demostraron que un RNA de doble cadena era capaz de direccionar la degradación de RNA mensajero (mRNA), con secuencias complementarias a una u otra cadena (1).

Fire-Mello estaban estudiando el efecto fenotípico de RNA inyectando en las gónadas del gusano *C. elegans* el gen *unc-22* que codifica para la proteína del miofilamento. Observaron que los cambios fenotípicos en el gusano solamente se producían cuando se inyectaba el RNA sentido y antisentido en forma de RNA de doble cadena (dsRNA), pero no cuando cada RNA era incorporado en forma de cadena sencilla. Además demostraron que el efecto de supresión sólo ocurría si el dsRNA que se introduce es complementario de una región codificante (exones), pero no si es complementario de una región no codificante (intrones o el promotor).

Esto indica que la interferencia se produce a nivel del RNA mensajero (mRNA), cuando ya se han eliminado los intrones del pre-mRNA, y por tanto es un mecanismo post-transcripcional. Finalmente la inyección de RNA bicatenario *unc-22*, y *gfp-LacZ* en la cabeza o cola de animales transgénicos para la proteína fluorescente GFP, demostró también producir interferencia pronunciada en la progenie y en todos los tejidos, indicando que el dsRNA fue amplificado o que actuaba catalíticamente.

Este trabajo busca, por lo tanto, analizar los usos del RNA de interferencia como método de terapia génica en el tratamiento de enfermedades.



## **JUSTIFICACIÓN.**

El RNA de interferencia es un potente método de silenciamiento de genes, que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años, como resultado de su extensiva importancia en el estudio de la genética, biología molecular y fisiología.

La tecnología del RNA de interferencia también ha profundizado en los sistemas inmunes innato y adaptativo, ayudando a elucidar numerosos mecanismos que regulan el desarrollo, activación y función de las células que median la inmunidad. En adición, gracias a su habilidad de suprimir la expresión de genes de manera efectiva, esta técnica puede ser usada para regular la respuesta inmune para propósitos clínicos. Por lo tanto, es importante para el QFB realizar una revisión exhaustiva de los beneficios de esta novedosa terapia, y de su aplicación en el campo clínico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.**

Realizar una investigación precisa, para exponer el fundamento, mecanismo y desarrollo del RNA de interferencia en enfermedades, así como los últimos avances de esta importante terapia en el ámbito científico.

### **Objetivos particulares.**

- ✚ Documentar el desarrollo de la terapia génica utilizando RNA de interferencia.
- ✚ Describir el mecanismo de acción del RNA de interferencia.
- ✚ Establecer ejemplos del uso del RNA de interferencia en la terapéutica actual.

## CAPÍTULO I

### DESARROLLO DEL RNA DE INTERFERENCIA COMO TERAPIA GÉNICA

#### 1.1. Estructura de lo ácidos nucleicos

Los organismos vivientes contienen dos clases de ácidos nucleicos: ácido ribonucleico (RNA) y ácido desoxirribonucleico (DNA). Las moléculas de DNA están formadas por dos cadenas de moléculas más simples llamadas hebras (*strands*). Cada hebra tiene un esqueleto consistente en repeticiones de la misma unidad básica llamada nucleótido, esta unidad está formada por una molécula de azúcar un grupo fosfato y una base nitrogenada.

El DNA y el RNA son químicamente muy similares, la estructura primaria de ambos son polímeros lineales compuestos de monómeros llamados nucleótidos. El RNA celular posee una longitud que va desde menos de cien hasta varios miles de nucleótidos. Las moléculas de DNA celular pueden ser tan largas como varios cientos de millones de nucleótidos (1).

El DNA y el RNA constan cada uno de sólo 4 nucleótidos distintos. Todos los nucleótidos tienen una base orgánica unida a un azúcar de cinco carbonos que posee un grupo fosfato unido al carbono 5. En el RNA, el azúcar es ribosa; en el DNA es desoxirribosa. Los nucleótidos que se utilizan en la síntesis de DNA y RNA contienen cinco bases diferentes. Las bases *adenina* (A) y *guanina* (G) son purinas, que contienen un par de anillos fusionado; las bases *citocina* (C), *timina* (T) y *uracilo* (U) son pirimidinas, que contienen un único anillo. Tanto el DNA como el RNA contienen tres de estas bases: A, G y C; sin embargo, T sólo se encuentra en el DNA y U sólo en el RNA.

Una sola hebra de ácido nucleico tiene un esqueleto compuesto por unidades repetidas de pentosa-fosfato a partir de la cual se extienden como grupos laterales las bases purina y pirimidina.

Como un polipéptido, una hebra de ácido nucleico tiene una orientación química, de extremo a extremo: el *extremo 5'* tiene un grupo hidroxilo o fosfato en el carbono 5' de su azúcar terminal; el *extremo 3'* generalmente contiene un grupo hidroxilo en el carbono 3' de su azúcar terminal. Esta dirección específica o polaridad, sumada al hecho de que la síntesis procede del 5' al 3', ha dado origen a la convención de leer y escribir las secuencias de polinucleótidos en la dirección 5'→3' (de izquierda a derecha); por ejemplo, la secuencia AUG se supone que es (5') AUG (3'). La direccionalidad 5'→3' de una hebra de ácido nucleico es una propiedad importante de la molécula. La unión química entre nucleótidos adyacentes, comúnmente denominada enlace fosfodiéster, en realidad consta de dos enlaces fosfoéster, uno en el lado 5' del fosfato y otro en el lado 3'.

La secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster constituye la estructura primaria de los ácidos nucleicos. Al igual que los polipéptidos, los polinucleótidos pueden enroscarse y plegarse para formar conformaciones tridimensionales estabilizadas por enlaces no covalentes. Si bien las estructuras primarias del DNA y el RNA suelen ser similares, sus conformaciones tridimensionales son bastante diferentes. Estas diferencias estructurales son críticas para las distintas funciones de los tipos de ácidos nucleicos.

La era moderna de la biología molecular comienza en 1953, cuando James D. Watson y H. C. Crick propusieron que el DNA tiene una estructura de doble hélice. La propuesta basada en análisis de patrones de difracción de rayos x asociados con una construcción cuidadosa de modelos, probó ser correcta y permitió las condiciones para nuestra comprensión actual de la forma de funcionar del DNA como material genético.

El éxito de éste modelo radicó en su consistencia con las propiedades físicas y químicas del DNA, Watson y Crick demostraron que las dos hebras de DNA están enlazadas entre sí porque cada base en una cadena está apareada (enlazada) con una base de la otra cadena. La base A siempre está enlazada con la base T y la base G con C; por esta razón decimos que A y T son bases complementarias al igual que G y C.

En la cadena de DNA el extremo 3' de una hebra corresponde al 5' de la otra. Esta propiedad se conoce como antiparalelismo de las hebras. La consecuencia fundamental de esta estructura es que es posible inferir la secuencia de una hebra dada la otra. La operación que permite realizar esto es llamada complementación inversa. Es precisamente este mecanismo que permite al DNA en una célula la replicación; por lo tanto también permite a un organismo que inicia su vida como una célula crecer hasta contener millones de células (2).

## **1.2. Transcripción de genes codificadores de proteínas**

La definición más simple de un gen es una “unidad de DNA que contiene la información para especificar la síntesis de la única cadena polipeptídica o RNA funcional”. La gran mayoría de los genes contienen información para construir moléculas proteicas, las copias de RNA de tales genes *codificadores de proteínas* constituyen las moléculas de mRNA de las células. Las moléculas de DNA de pequeños virus contienen sólo algunos genes, mientras que la molécula de DNA en cada uno de los cromosomas de los animales y plantas superiores puede contener varios de miles.

Durante la síntesis de RNA, el lenguaje de cuatro bases del DNA, que contiene A, G, C y T simplemente es copiado o *transcripto*, al lenguaje de cuatro pares de bases de RNA, que es idéntico con la excepción de que U reemplaza a T. Por el contrario, durante la síntesis de proteínas, el lenguaje de cuatro bases del DNA y del RNA es *traducido* al lenguaje de 20 aminoácidos de las proteínas (3).

### 1.2.1. La RNA polimerasa transcribe una hebra molde de DNA para formar una hebra complementaria de RNA

Durante la transcripción de DNA, una hebra de DNA actúa como un *molde* o *patrón*, determinando el orden en que los monómeros de ribonucleótido trifosfato (rNTP) son polimerizados para formar una cadena complementaria de RNA.

Las bases en la hebra de patrón de DNA forman pares de bases con los monómeros de rNTP complementarios entrantes, que luego se unen en una reacción de polimerización catalizada por una RNA polimerasa (RNA pol). La polimerización implica un ataque nucleofílico del oxígeno 3' en la cadena creciente de RNA sobre el fosfato  $\alpha$  del siguiente nucleótido precursor a ser añadido, lo que da lugar a la formación de un enlace fosfodiéster y la liberación de un pirofosfato (PP<sub>i</sub>). Como consecuencia de este mecanismo, las moléculas de RNA siempre se sintetizan en la dirección 5'→3'.

La energía de la reacción de polimerización favorece fuertemente la adición de ribonucleótidos a la cadena de RNA en crecimiento debido a que el enlace de alta energía entre el fosfato  $\alpha$  y  $\beta$  de los monómeros es reemplazado por el enlace fosfodiéster, de menor energía, entre los nucleótidos. El equilibrio para la reacción se desplaza más hacia la elongación de la cadena por acción de la pirofosfatasa, una enzima que cataliza la escisión de PP<sub>i</sub> en dos moléculas de fosfato inorgánico. Al igual que las dos hebras en el DNA, la hebra molde de DNA y la hebra en crecimiento de RNA, que está apareada por sus bases a ella, tienen una direccionalidad 5'→3' opuesta.

Por convención, el sitio en el cual la RNA polimerasa comienza la transcripción se numera +1. Se denomina corriente abajo a la dirección en la cual una hebra molde de DNA es transcrita (o el mRNA es traducido); así, una secuencia corriente abajo se dirige hacia el extremo 3' en relación al sitio de inicio, considerando la hebra de DNA con la misma polaridad que el RNA transcrito. Corriente arriba indica la dirección opuesta. Las posiciones de los nucleótidos en la secuencia de DNA corriente abajo desde el sitio de inicio se indican con signo positivo (+); aquellas corriente arriba, con un signo negativo (-) (3).

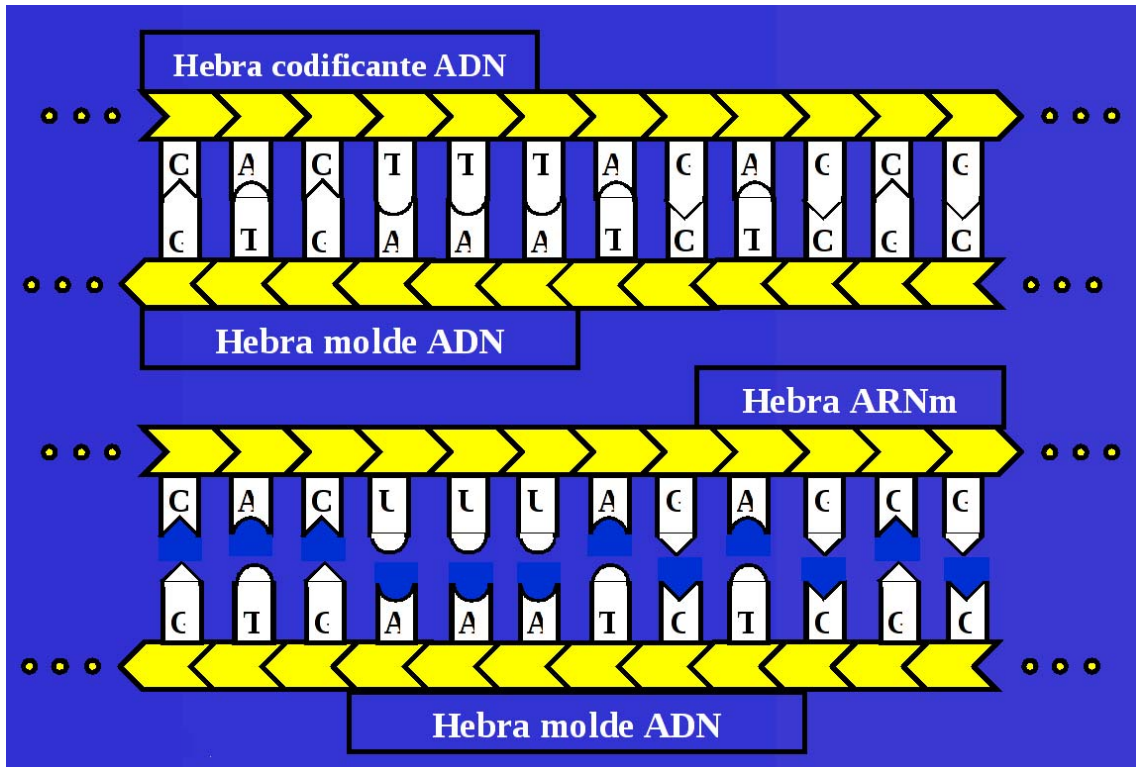
### 1.3. Etapas de la transcripción

Un mecanismo en la célula reconoce el inicio de un gen o grupo de genes gracias al promotor de un gen que es la sección de DNA que controla la iniciación de la transcripción del RNA como producto de ese gen, el codón AUG también señala el inicio de un gen y una vez que es reconocido el inicio de un gen o grupo de genes, se realiza una copia del gen en una molécula de RNA.

El RNA resultante es llamado RNA mensajero (RNAm) y tiene exactamente la misma secuencia que una de las hebras del gen pero substituyendo la base U por T. Este proceso es llamado transcripción, El RNAm será entonces usado en los ribosomas (orgánulos celulares) para fabricar una proteína.

Debido a que el RNA está formado por una sola hebra y no dos como el DNA, el RNAm producido es idéntico en secuencia a sólo una de las hebras del gen, siendo complementario a la otra (tomando en cuenta que T es remplazado por U). La hebra que es similar al RNAm producido es llamada la hebra codificante y la otra hebra no-codificante o hebra molde. La hebra molde es aquella que realmente se transcribe, porque el RNAm está compuesto al unir ribonucleótidos complementarios a esta hebra; este proceso siempre construye moléculas de RNAm del extremo 5' al extremo 3', mientras que la hebra molde es leída del extremo 3' al 5'. Ver Figura 1.

La hebra molde para los genes no es siempre la misma. Por ejemplo, la hebra molde para un cierto gen A puede ser una de las hebras, y la hebra molde para otro gen B puede ser la otra hebra; para un gen dado, la célula puede reconocer la hebra molde correspondiente gracias a un promotor, aún cuando el complemento inverso de un promotor aparece en la otra hebra, éste no es un promotor y por lo tanto no será reconocido como tal (1).



**Figura 1.** Mecanismo por el cual se lleva a cabo la transcripción, utilizando una hebra molde de DNA y una hebra codificante de DNA (2).

Para llevar a cabo la transcripción, es necesaria una RNA polimerasa que desempeña varias funciones distintas. Durante la *iniciación* de la transcripción, la RNA polimerasa reconoce y se une a un sitio específico (promotor), en el DNA de hebra doble. Las RNA polimerasas nucleares requieren diversos factores proteicos, denominados factores de transcripción generales, para ayudarlas a localizar los promotores e iniciar la transcripción. Luego de unirse al promotor, la RNA pol disocia las hebras de DNA para hacer que las bases en la hebra molde estén disponibles para el apareamiento con las bases de los ribonucleótidos trifosfatos que se polimerizarán. Las RNA polimerasas celulares disocian aproximadamente 14 pares de bases de DNA alrededor del sitio de inicio de la transcripción, localizado en la hebra molde dentro de la región del promotor. Se considera que la iniciación de la transcripción se ha complementado cuando los dos primeros ribonucleótidos de una cadena de RNA están unidos mediante un enlace fosfodiéster.



Después de que varios ribonucleótidos han sido polimerizados, la RNA pol se disocia del DNA promotor y de los factores de transcripción generales. Durante la etapa de *elongación de las hebras*, la RNA pol se mueve a lo largo del DNA molde de a una base por vez, abriendo el DNA doble hebra delante de su dirección de movimiento e hibridando las hebras detrás de sí. Durante la elongación de la hebra, ejecutada por la polimerasa, los ribonucleótidos se añaden uno por uno al extremo 3' de la cadena creciente (*naciente*) de RNA. La enzima mantiene disociada una región de alrededor de 14 pares de bases (pb), denominada *burbuja de transcripción*. Aproximadamente ocho nucleótidos en el extremo 3' de la hebra de RNA en crecimiento permanecen apareados por sus bases a la hebra molde de DNA en la burbuja de transcripción. El complejo de elongación, que comprende la RNA pol, el DNA molde y la hebra creciente de RNA es extraordinariamente estable.

Durante la *terminación* de la transcripción, la etapa final de la síntesis de RNA, la molécula completa de RNA, o transcrito primario, se libera de la RNA pol y ésta se disocia del DNA molde. Secuencias específicas en el DNA molde le señalan a la RNA pol implicada que termine la transcripción. Una vez liberada, la RNA pol está libre para transcribir de nuevo el mismo gen u otro (3).

#### **1.4. Las tres funciones del RNA en la traducción**

Si bien el DNA almacena información para la síntesis de proteínas y el mRNA transmite las instrucciones codificadas en el DNA, la mayoría de las actividades biológicas son realizadas por proteínas. El orden lineal de cada proteína determina su estructura tridimensional y su actividad. Por esta razón el ensamblaje de aminoácidos en el orden correcto, como está codificado en el DNA, es crítico para la producción de proteínas funcionales y por lo tanto para el correcto funcionamiento de células y organismos.

La traducción es el proceso por el cual la secuencia de nucleótidos de un mRNA es utilizada para ordenar y unir los aminoácidos en una cadena polipeptídica. En las células eucariontes, la síntesis de proteínas tiene lugar en el citoplasma, donde tres tipos de moléculas de RNA se reúnen para realizar funciones distintas pero cooperativas.

1. El RNA mensajero (mRNA) transporta la información genética transcrita desde el DNA, bajo la forma de una serie de secuencia de tres nucleótidos, denominados codones, cada uno de los cuales especifica un aminoácido en particular.
2. El RNA de transferencia (tRNA) es la clave para descifrar los codones en el mRNA. Cada tipo de aminoácido tiene su propio subgrupo de tRNA, que une el aminoácido y lo transporta hasta el extremo creciente de la cadena polipeptídica, si el próximo codón en el mRNA así lo requiere. El tRNA correcto, con su aminoácido adosado, es seleccionado a cada paso, porque cada molécula específica de tRNA contiene una secuencia de tres nucleótidos, un anticodón, que puede aparear bases con su codón complementario en el mRNA.
3. El RNA ribosómico (rRNA) se asocia con un conjunto de proteínas para formar ribosomas. Estas complejas estructuras se mueven a lo largo de una molécula de mRNA, catalizan el ensamblaje de aminoácidos para formar cadenas polipeptídicas. También unen tRNA y diversas proteínas accesorias necesarias para la síntesis de proteínas. Los ribosomas están compuestos de una subunidad mayor y una menor, cada una de las cuales contiene su propia molécula o moléculas de rRNA.

Estos tres tipos de RNA participan en la traducción de todas las células. En efecto, el desarrollo de tres RNA funcionales distintos fue probablemente la clave molecular para el origen de la vida (3).

La síntesis de proteínas tiene lugar dentro de los ribosomas, los cuales están hechos de proteínas y rRNA.

Los ribosomas funcionan como una línea de ensamble en una fábrica la cual usa como entrada una molécula de mRNA y otra de tRNA. Las moléculas de tRNA son las que en realidad implementan el código genético en la traducción. Éstas hacen la conexión entre un codón y el aminoácido específico que codifica.

Cada molécula de tRNA tiene, por un lado, una configuración que tiene alta afinidad por un codón específico y, por otro lado, una configuración que se acopla fácilmente al aminoácido específico, así que, a medida que el mRNA pasa a través del interior del ribosoma, un tRNA correspondiente al codón actual (en el interior del ribosoma) se acopla a éste creando el aminoácido correspondiente.

La posición 3D de todas estas moléculas en ese momento es tal que, a medida que el tRNA se acopla a su codón, su aminoácido adjuntado cae en el lugar justo después del aminoácido previo de la cadena proteínica que está formándose, una enzima adecuada entonces cataliza la adición del aminoácido actual, liberándolo del tRNA. Las proteínas son construidas residuo por residuo de esta manera. Cuando un codón de parada aparece, ningún tRNA se asocia con él, por lo que la síntesis se detiene. El mRNA es liberado y degradado por mecanismos de la célula en ribonucleótidos, los cuales serán después reciclados para hacer otras moléculas de RNA (1).

#### **1.4.1. Expresión génica**

La expresión génica es un proceso global de lectura selectiva y utilización de la información genética, es generalmente controlada a nivel de la transcripción, el primer paso en la producción de una proteína. De este modo las células pueden producir un mRNA particular solo cuando la proteína codificada es necesaria y, por lo tanto, reduciendo el desperdicio de energía. Sin embargo, la producción de un mRNA es el primero de los episodios de una cadena que determina en conjunto si un producto proteico activo es producido a partir de un gen particular.

El control transcripcional de la expresión génica fue demostrado primero en la respuesta a la bacteria *E. coli* hacia diferentes fuentes de azúcares. Las células de *E. coli* prefieren glucosa como fuente de azúcar, pero pueden sobrevivir sobre una pizca de lactosa. Estas bacterias utilizan proteínas de unión de DNA, tanto *represoras* como *activadoras* para cambiar la velocidad de la transcripción de los tres genes necesarios para metabolizar la lactosa según las cantidades relativas de glucosa y lactosa presentes.

En las células eucariotas el control de la actividad génica suele involucrar un balance entre las acciones de los activadores y los represores transcripcionales. La unión de activadores a secuencias regulatorias específicas de DNA, denominadas amplificadores, activa la transcripción y la unión de represores en otras secuencias regulatorias denominadas silenciadoras inactiva la transcripción (1).

### **1.5. Terapia génica**

En términos moleculares, un gen se define como la *secuencia completa de ácidos nucleicos necesaria para la síntesis de un producto génico funcional (polipéptido o RNA)*. De acuerdo con esta definición, un gen incluye más que los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de una proteína, denominada *región codificadora*; incluye también todas las secuencias de DNA requeridas para la síntesis de un transcripto particular de RNA. En los genes eucariontes las regiones de control de la transcripción conocidas como secuencias amplificadoras o amplificadores pueden estar a 50 kb o más de distancia de la región codificadora (3).

En la actualidad, la dotación genética de una célula puede ser modificada mediante la introducción de un gen normal en el organismo diana que sustituya al gen defectuoso en su función; es lo que se denomina terapia génica.

La terapia génica se puede definir como el conjunto de técnicas que permiten vehicular secuencias de DNA o de RNA al interior de células diana, con objeto de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce.

### 1.5.1. Clasificación

En función del tipo celular diana, existen dos modalidades de terapia génica:

1) Terapia génica de células germinales: aquella dirigida a modificar la dotación genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides y, por tanto, transmisible a la descendencia. Este tipo de terapia génica sería la indicada para corregir de forma definitiva las enfermedades congénitas, una vez que la técnica sea eficaz y segura, situación que no parece darse en el momento actual.

La terapia génica de la línea germinal humana no ha sido practicada debido a las limitaciones de la tecnología de manipulación de las células germinales y a considerados éticos, en especial el peligro de la modificación del acervo genético de la especie humana y el riesgo de potenciación genética, que derivaría en prácticas de eugenesia por selección artificial de genes que confiriesen caracteres ventajosos para el individuo.

2) Terapia génica somática: aquella dirigida a modificar la dotación genética de células no germinales, es decir, de las células somáticas o constituyentes del organismo. Por ello, la modificación genética no puede transmitirse a la descendencia. Por consenso general entre los investigadores y con la legislación actual, basada en motivos éticos y de seguridad, solamente se llevan a cabo protocolos clínicos en este tipo de terapia génica.

En principio, la terapia génica somática no ha sido motivo de reservas éticas, salvo las relacionadas con su posible aplicación a la ingeniería genética de potenciación, es decir, toda manipulación genética cuyo objetivo sea potenciar algún carácter, como la altura, sin pretender tratar enfermedad alguna.

Por otra parte, y en función de la estrategia aplicada, la terapia génica también puede clasificarse en:

- Terapia génica *in vivo*: agrupa las técnicas en las que el material genético se introduce directamente en las células del organismo, sin que se produzca su extracción ni manipulación *in vitro*. La gran ventaja de las técnicas *in vivo* sobre la terapia génica *in vitro* es su mayor sencillez. Sin embargo, tienen el

inconveniente de que el grado de control sobre todo el proceso de transferencia es menor (dado que no pueden amplificarse las células transducidas) y, finalmente, es difícil conseguir un alto grado de especificidad tisular.

- Terapia génica *ex vivo*: comprende todos aquellos protocolos en los que las células a tratar son extraídas del paciente, aisladas, crecidas en cultivo y sometidas al proceso de transferencia *in vitro*. Una vez que se han seleccionado las células que han sido efectivamente transducidas, se expanden en cultivo y se introducen de nuevo en el paciente. Sus principales ventajas son el permitir la elección del tipo de célula a tratar, mantener un estrecho control sobre todo el proceso, y la mayor eficacia de la transducción genética. Los problemas más importantes de esta modalidad son la mayor complejidad y coste de los protocolos, así como la imposibilidad de transducir aquellos tejidos que no son susceptibles de crecer en cultivo; además, existe siempre el riesgo inherente a la manipulación de las células en cuanto a problemas de contaminación.

En las últimas dos décadas aproximadamente, los conceptos y la tecnología de la ingeniería genética aplicados a la terapéutica han pasado desde la ciencia ficción al inicio de su experimentación clínica. Esta tecnología ha evolucionado rápidamente, y en la actualidad hay más de 200 protocolos de terapia génica en fase de ensayo clínico.

Por ello, si bien la terapia de fundamento genético se encuentra mayoritariamente en fase de experimentación, estas técnicas se incorporarán al arsenal terapéutico en un futuro nada lejano para su uso clínico seguro y eficaz (7).

### **1.5.2. Terapia antisentido**

El término antisentido se aplica a secuencias cortas de DNA o RNA (oligonucleótidos) diseñadas para ser complementarias de secuencias génicas específicas, con el fin de interferir el flujo de información genética.

Los agentes terapéuticos antisentido inhiben la síntesis proteica al interferir los procesos de transcripción y/o traducción. Existen tres clases principales:

-Secuencias antisentido: derivan de ácidos nucleicos que se unen (hibridan) con hebras con mRNA citosólicas (hebras con antisentido: portadoras de información necesaria para la síntesis de proteínas en los ribosomas) o de hnRNA (precursor nuclear del mRNA) a través de puentes de hidrógeno, por complementariedad de las bases correspondientes del ácido nucleico. Normalmente, las secuencias antisentido son secuencias cortas de ácido nucleico, por lo que habitualmente se les denomina oligonucleótidos antisentido.

-Secuencias antigen: de forma similar a las secuencias antisentido, las secuencias antigen se hibridan al DNA de doble hebra localizado en el núcleo, creando secuencias en triple hélice que bloquean la transcripción del gen correspondiente, bien directamente o bien interfiriendo en la unión con proteínas a secuencias específicas del DNA.

-Ribozimas: los RNA antisentido pueden catalizar enzimáticamente la hidrólisis de secuencias específicas de mRNA. Estos RNA catalíticos se denominan ribozimas, y actúan sobre sustratos naturales concretos (7).

### **1.6. Desarrollo del RNA de interferencia como inhibidor de expresión de genes**

El RNA de interferencia es un potente método de silenciamiento de genes, que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años, como resultado de su extensiva importancia en el estudio de la genética, biología molecular y fisiología.

La tecnología del RNA de interferencia también ha profundizado en los sistemas inmunes innato y adaptativo, ayudando a elucidar numerosos mecanismos que regulan el desarrollo, activación y función de las células que median la inmunidad. En adición, gracias a su habilidad de suprimir la expresión de genes de manera efectiva, esta técnica puede ser usada para regular la respuesta inmune para propósitos clínicos.

El fenómeno del RNA de interferencia fue observado, como se apuntó en la introducción, a finales de la década de los 80's, y ha evolucionado como una potente técnica de silenciamiento de genes. Ha emergido como una poderosa alternativa para las terapias convencionales de reemplazamiento de genes, para el tratamiento de desórdenes genéticos.

Una vez que estuvo claro que el RNAi (RNA de interferencia) actuaba directamente sobre el mRNA, el siguiente paso fue determinar el mecanismo por el que el RNAi silenciaba estos genes específicos (8).

### 1.6.1. Mecanismo del RNAi

Los RNAi son moléculas pequeñas (20-25 nucleótidos) que se generan por fragmentación de precursores más largos, como pueden ser RNA virales, transposones, dsRNA exógenos (siRNA) y miRNA endógenos.

Mediante la introducción simple de RNA bicatenario (dsRNA= *double-stranded RNA*) en una célula se pueden reprimir los genes que contienen secuencias idénticas (o muy semejantes) a ese dsRNA. En este caso el experimento se realizó en el verme *C. elegans*.

La introducción de RNA bicatenario (dsRNA) en el *C. elegans* inactivaba al gen homólogo con respecto a ese dsRNA. Este descubrimiento inesperado y el análisis posterior de la interferencia del RNAi son significativos en dos sentidos. En primer lugar, la RNAi parece ser universal porque la introducción del dsRNA en casi todas las células de animales, hongos y vegetales produce la degradación del mRNA en función de su homología.

De hecho, gran parte de nuestro conocimiento sobre el RNAi proviene de estudios vegetales. En segundo lugar se debe destacar la rapidez con que la investigación experimental relacionada con este proceso misterioso reveló sus mecanismos moleculares.

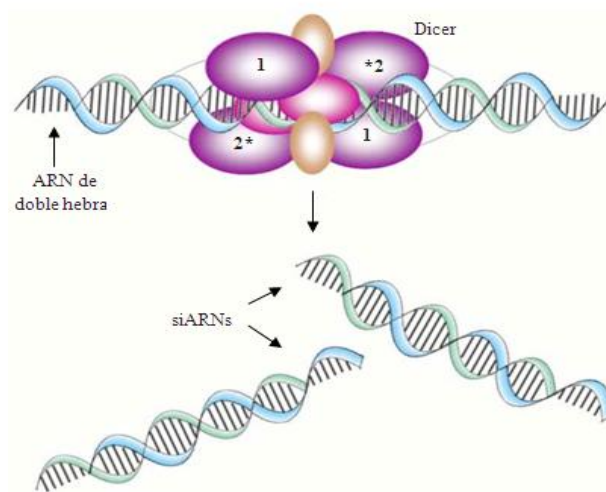
Un efecto similar se ve en muchos otros organismos en los que se lo experimentó con ulterioridad. Sin embargo, antes de esta comunicación ya se sabía que en los vegetales los genes podían ser silenciados por copias de genes homólogos en la misma célula. Estos transgenes adicionales con frecuencia se hallaban en numerosas copias, algunos integrados, en orientación de repetición directa. Además, en los vegetales se sabía que la infección por virus se combatía por un mecanismo que comprendía la destrucción del RNA vírico.



Estos dos casos se reunieron en la observación siguiente: la infección de un vegetal por un virus de RNA portador de una copia de gen vegetal endógeno conducía al silenciamiento de ese gen endógeno. Se sabe que todos estos fenómenos están vinculados en forma mecánica (8).

### 1.6.2. siRNAs

Son hebras de RNA de doble cadena, una de ellas es antisentido y la otra es en sentido del mRNA que se quiere silenciar. Estos RNA cortos (con frecuencia denominados RNA interferentes cortos o siRNA, (del inglés *short interfering RNA*) inhiben la expresión de un gen homólogo de tres maneras: desencadenan la destrucción de su mRNA, inhiben la traducción de su mRNA o inducen modificaciones cromatínicas en el promotor que silencia el gen. Lo destacable es que, cualquiera que sea el mecanismo utilizado en cualquier caso dado, se necesita en gran parte de la misma maquinaria.



**Figura 2.** Generación de siRNAs, mediada por Dicer, a partir de RNA de doble hebra. Los números indican los dominios antiparalelos de cada proteína Dicer. El asterisco (\*) indica el sitio activo defectuoso de Dicer. Modificado de Hannon GI, 2004 (8).

El siRNA proviene de un dsRNA más largo catalizado por la enzima Dicer (RNasa tipo III). Dicer (que puede traducirse como “picadora” o “moledora”) es una enzima que reconoce y digiere dsRNA largos.

Esta enzima es un miembro de la familia de ribonucleasas RNasa III, la cual esta conservada evolutivamente. Dicer contiene un dominio de unión a dsRNA y un dominio PAZ (Piwi/Argonauta/Zwille), cuya función es la unión con el RNA. Se cree que esta RNasa III actúa como una enzima dimerica.

El alineamiento antiparalelo de los dominios RNasa III de Dicer sobre el sustrato de dsRNA produce 4 sitios activos compuestos, pero los dos centrales son defectuosos, uno de cada proteína.

Así, el corte del dsRNA ocurre a intervalos de aproximadamente 22 pb y da lugar a los. Esto se muestra en la Figura 2.

El mecanismo del RNAi puede también inducirse mediante la presencia de siRNAs codificados directamente desde el núcleo, o bien siRNAs generados a partir de un vector de ADN que contiene un promotor específico de tejido y que sintetiza constitutivamente a estos siRNAs. Cualquiera que sea su origen los siRNAs presentan algunas características en común: contienen de 21 a 23 nucleótidos de longitud y son dúplex con morfología tipo pasador o tallo-asa (*hairpin*); contienen un extremo 5' fosforilado y un extremo 3' con dos nucleótidos que sobresalen de la estructura tipo pasador. Estas características los hacen específicos para que puedan ser reconocidos por el complejo silenciador inducido por RNA llamado RISC (8).

### 1.6.3. RISC

El complejo enzimático llamado RISC (por sus siglas en inglés, RNA inducing silencing complex), es una nucleasa efectora multicomponente que reconoce al siRNA dúplex y, como presenta actividad helicasa lo que hace es deshebrar al siRNA dúplex, con el ingreso de ATP, a través de la proteína catalítica llamada Argonauta.

De esta forma, RISC junto con el siRNA de una sola hebra, detecta al mRNA blanco al reconocerlo por apareamiento de bases de Watson y Crick altamente específica. El silenciamiento génico postranscripcional (proceso completamente citoplasmático) es el resultado del corte endonucleolítico del mRNA blanco mediante una enzima con actividad de RNasa H conocida como *slicer* la cual tiene un dominio denominado PIWI que interviene en el silenciamiento génico.

El corte sólo ocurre en la región homóloga entre el mRNA y el siRNA. Además, RISC tiene la capacidad de degradar completamente al mRNA. Por si fuera poco, RISC posee actividad de polimerasa, de modo que emplea los mismos siRNAs como molde para hacer múltiples copias y amplificar la señal del silenciamiento.

Como se ilustra en la figura 3, una vez que se elaboró y se lo armó en un complejo RISC, un siRNA dado se desnaturaliza de una manera dependiente del ATP. La interacción con RISC provoca un desapareamiento de las dos hebras de siRNA, quedándose unida la antisentido, que será la que actuará como guía para seleccionar su diana. La aparición de RNA monocatenario activa el complejo RISC (indicado con un asterisco en la figura 3). Una vez activado, el complejo se dirige hacia un RNA con una secuencia complementaria del siRNA. Una vez allí, puede degradar ese RNA o inhibir su traducción.

Parece que en los casos típicos, el mecanismo elegido depende, por lo menos en parte, de la precisión de la coincidencia del siRNA y el mRNA diana: si son complementarios, el mensajero se degrada; si la coincidencia no es tan buena, la respuesta es sobre todo una inhibición de la traducción. En este caso una actividad de nucleasa dentro del RISC tiene a su cargo la degradación.

Un complejo RISC, también puede ser dirigido por un siRNA hacia el núcleo, en cuyo interior se asocia con regiones del genoma complementarias de ese siRNA (a la izquierda de la figura 3). Una vez allí, el complejo recluta otras proteínas que modifican la cromatina alrededor del promotor del gen. Esta modificación conduce al silenciamiento de la transcripción.

Esto puede aprovecharse para permitir la inhibición específica de la función de los genes elegidos, incluyendo los genes implicados en ciertas enfermedades, tales como cáncer, SIDA y hepatitis. El RNA de interferencia ha probado que es una invaluable herramienta de investigación, ya que permite una más rápida caracterización de genes conocidos. Pero lo más importante, la tecnología refuerza la genómica funcional para ayudar en la identificación de nuevos genes involucrados en los procesos de las enfermedades.

Esta represión (RNAi) puede manifestarse como inhibición de la traducción del mRNA, destrucción del mRNA o silenciamiento transcripcional del promotor que dirige la expresión de ese mRNA. El papel de estos RNA abarca desde la regulación del desarrollo, hasta la protección contra la infección de ciertos virus (en vegetales).

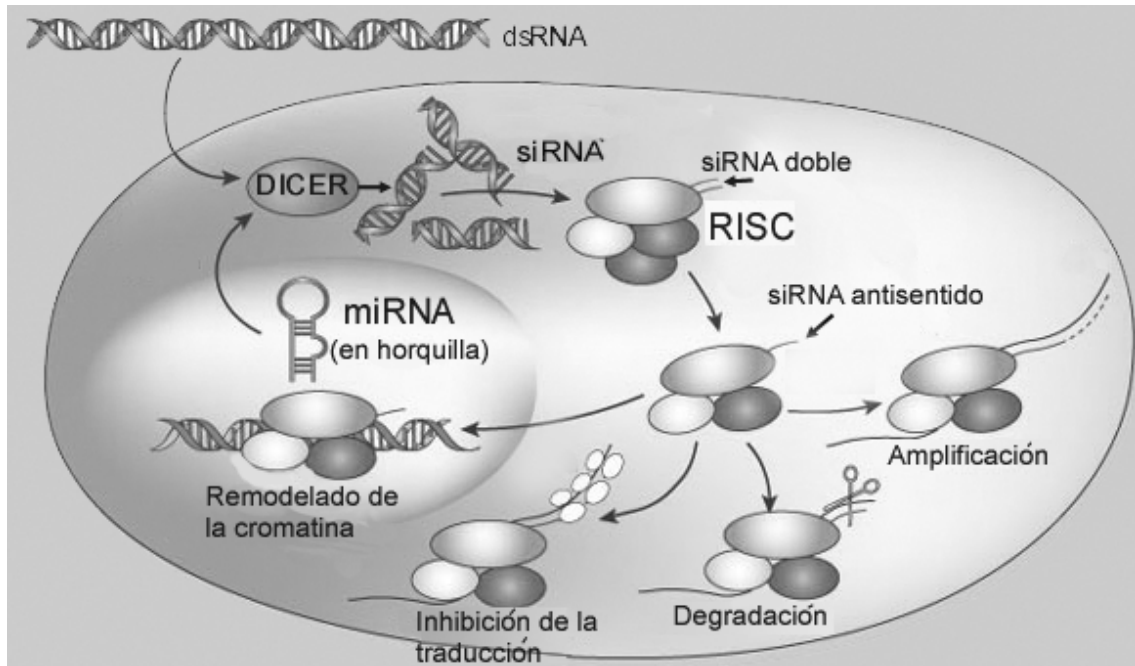
La RNAi también se adaptó para su uso como una técnica de experimentación muy poderosa que permite que se desactiven genes específicos en cualquiera de muchos organismos.

Hace poco se demostró que el establecimiento del silenciamiento en las regiones centroméricas de los cromosomas de la levadura *S. pombe* necesita de la maquinaria de la RNAi. En ese caso se cree que regiones del centrómero se transcriben para producir RNA que se pliegan para formar tallos-asas o se hibridan con otros RNA de la misma región. Dicer reconoce los dsRNA resultantes y los escinde para producir los siRNA que dirigen la maquinaria de la RNAi hacia los centrómeros (8).

Hay otra característica del silenciamiento por RNAi digna de mención, su eficacia suprema. Así, cantidades muy pequeñas de dsRNA bastan para inducir la clausura completa de los genes diana. Aunque no se sabe porqué el efecto es tan intenso, podría ser que interviniera una *RNA polimerasa dependiente de RNA* que se necesita en casos de RNAi.

La participación de esta enzima indica que algún aspecto de la “señal” inhibidora podría amplificarse como parte del proceso. Una forma en que podría lograrse esto la delata la observación siguiente. Cuando un siRNA dado tiene como diana una región de un mRNA específico, con frecuencia se generan siRNA adicionales que tienen como diana regiones contiguas de ese mismo mRNA.

La RNA polimerasa dependiente de estos siRNA adicionales podría tener un papel en la generación de estos siRNA adicionales después del reclutamiento hacia el mRNA por el siRNA original (parte derecha de la figura 3) (4).



**Figura 3.** Silenciamiento por RNAi. La RNAi desactiva la expresión de un gen dado cuando se elabora o se introducen en la célula moléculas de RNA bicatenario con homología para ese gen. Este efecto comprende el procesamiento de dsDNA para que la enzima Dicer forme RNA interferentes cortos. Luego, estos siRNA dirigen un complejo llamado RISC (complejo silenciador inducido por RNA) para que reprima genes de tres maneras. Ataca y dirige el mRNA de homología con el siRNA; interfiere la traducción de esos mRNA o recluta enzimas modificadoras de la cromatina hacia los promotores que dirigen la expresión de esos mRNA. Aunque en la figura el RISC desempeña algunas funciones en el citoplasma y después se introduce en el núcleo para desempeñar otra, todas podrían cumplirse en el núcleo (4).

#### 1.6.4. Remodelación de la cromatina y siRNAs

Además de inhibir la traducción y degradar el mRNA, el RNAi también está implicado en la inhibición transcripcional por remodelación de la cromatina. Durante el proceso de la interferencia con RNA, la hebra antisentido es usada para reclutar proteínas que inhiben la transcripción. La hebra antisentido reconoce la posición correcta a lo largo de la secuencia del DNA por apareamiento de bases complementarias, ya sea con el DNA o con el mRNA recientemente generado durante la transcripción. El proceso es más complicado y se piensa que incluye componentes como RISC, metilasas o desacetilasas de histonas y polimerasa.

La intervención de siRNAs en la formación de heterocromatina ha sido ampliamente estudiada en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, en la cual, los siRNAs heterocromáticos actúan mediante el complejo efector de RITS (iniciador del silenciamiento génico transcripcional inducido por RNA) estructurado por una proteína argonauta (Ago 1) homóloga a la encontrada en el complejo RISC; una proteína de cromodominio asociada a heterocromatina o Chp1 (que también une repeticiones centroméricas requeridas para la metilación de la histona H3-K9) y Tas3, una subunidad de función desconocida asociada a Chp 1.

Los siRNAs heterocromáticos derivan de las regiones centroméricas cromosómicas y tienen una función secuencia-específica en el DNA.

De acuerdo a su origen y función en células humanas, dos tipos de RNA pequeños disparan el mecanismo de RNAi. Por un lado los RNA de interferencia pequeños (RNAip) y los RNA en horquillas pequeños (RNAhp), los cuales son producto del procesamiento de dsRNA largos sintetizados en laboratorio e introducidos a la célula; y por otro lado los microRNA (miRNA), originados de la transcripción de genes especiales localizados dentro del genoma de la propia célula y su procesamiento a partir de precursores.

Existe otro tipo de pequeños RNAs dentro de la célula, los cuales controlan el desarrollo larvario en *C. elegans*. Éstos son productos de los genes *lin-4* y *let-7*, los cuales codifican para RNAs de 22 nucleótidos, respectivamente. Estos genes son expresados en tiempos específicos y reprimen algunos genes que codifican proteínas y que gobiernan diversas etapas y eventos del desarrollo larval. Su expresión etapa-específica y su papel en los eventos de regulación les han acreditado su nombre: pequeños RNAs temporales o stRNAs, los cuales también se presentan durante el desarrollo embrionario en humanos. En este caso, los microRNAs (miRNAs) son codificados en el núcleo como pre-microRNAs, de aproximadamente 70 nt de longitud, por la RNA polimerasa II usando como templado intrones de genes codificantes o intrones y exones de transcritos no codificantes. Estos pre-microRNAs son procesados por un complejo proteico que contiene una ribonucleasa denominada Drosha (Drosha es requerida específicamente para el procesamiento de precursores de miRNA) (6), y por

una proteína de unión al RNA conocida por humanos como DGCR8, para formar la estructura tipo tallo-asa (*hairpin*). El pre-microRNA es transportado por la exportina 5 factor de exportación nuclear (6) al citoplasma, en donde son madurados en microRNAs por la ribonucleasa III Dicer eliminando la estructura *hairpin* y permitiendo su asociación al complejo RISC (8).

#### **1.6.5. Ensamble de miRNA**

Posterior al procesamiento de los RNA a través del Dicer, los RNAip y los miRNA ya maduros ensamblan en grupos de partículas ribonucleoprotéicas o RNPs. Los cuales ya funcionales, contienen únicamente una sola cadena de RNAip o miRNA, aquella que es homóloga o antisentido al RNAm objetivo.

Si bien, es difícil designar funciones distintivas, el complejo efector que monta en su estructura al RNAip es comúnmente referido como complejo silenciador inducido por RNA (RISC), mientras que el complejo efector que mantiene a un miRNA se denomina complejo ribonucleoproteico (miRNP).

Cada RISC o miRNP contiene un miembro de la familia de las proteínas Argonauta (Ago); las cuales probablemente se unen al RNA de manera directa en estos complejos, sin embargo se requiere mayor evidencia.

Presumiblemente el ensamble de los miRNP es dependiente de ATP, lo cual puede reflejar el requerimiento energético en el desarrollamiento de los RNAip/miRNA dúplex y/o algún cambio conformacional o composicional. Como ya se mencionó, la cadena que permanece montada es la cadena antisentido del RNAip/miRNA complementaria al gen objetivo propiamente su RNAm.

El RNAip/miRNA de cadena sencilla (cd) que permanece en el RISC/miRNP se encuentra extremadamente unido a una proteína Ago.

Concentraciones de sal tan altas como KCL 2.5 M no afectan la disociación de los RNA pequeños con la proteína Ago durante la purificación por afinidad del RISC.

Las proteínas Ago tienen un peso molecular de alrededor de 100 kDa y poseen dos dominios conservados PAZ y PIWI (9).

### **1.7. Degradación del RNAm y represión traduccional por miRNA**

Los RNAs en RISC guían la degradación específica de secuencia de los RNAm objetivo complementarios o casi complementarios. RISC corta al RNAm a la mitad de la región complementaria. 10 nt río arriba del nucleótido emparejado con el extremo 5' del RNAi guía. La reacción de escisión guiada mediante RISC/miRNP es un proceso que no requiere ATP. Sin embargo, se ha observado que el silenciamiento genético resulta ser más eficiente en su presencia.

Los complejos RISC/miRNP catalizan la hidrólisis del enlace fosfodiéster del RNAm dejando terminaciones fosfato 5' e hidroxilo 3'. Esta reacción también requiere iones Mg, al igual que la reacción hidrolítica que ocurre cuando Dicer genera los RNAi de los RNAdc precursores. Sin embargo, dentro de los candidatos para este importante proceso puede descartarse a Dicer.

La Tudor-SN caracterizada también como componente de RISC, puede ser rechazada como la endonucleasa en cuestión, ya que como miembro de la familia proteica de las nucleadas micrococales, debe generar terminaciones fosfato 3' en vez de fosfato 5'.

Recientemente se ha propuesto con base en la similitud del dominio PIWI con la RNAasa H, que las proteínas Ago pueden actuar por sí misma como nucleasas, lo cual falta de confirmarse, pues únicamente Ago2 es el miembro de la familia que presenta esta propiedad.

En el caso de los miran, su sitio de unión al RNAm sobresale por ser de una complementariedad insuficiente para llevarse a cabo el corte hidrolítico; aunque se ha visto que puede realizarse bajo ciertas condiciones especiales. El mecanismo general de acción es la represión traduccional. La primera evidencia fue observada en *C. elegans*



donde se demostró que los miRNA específicos para un gen reducían la síntesis de proteínas sin afectar los niveles del RNAm los cuales poseían en si región no traducible (UTR) 3' varios sitios de unión para el miRNA, y tanto el RNAm como el miRNA bloquean la elongación o terminación de la traducción, no así su iniciación (9).

### **1.8. Liberación de siRNAs en células blanco y efectos secundarios**

El uso de los siRNAs como una terapia para enfermedades autosómicas, cáncer e infecciones virales ha tomado gran importancia en los últimos años, y un punto muy importante para que esto pueda ser llevado a la clínica implica desarrollar metodologías para su liberación en humanos.

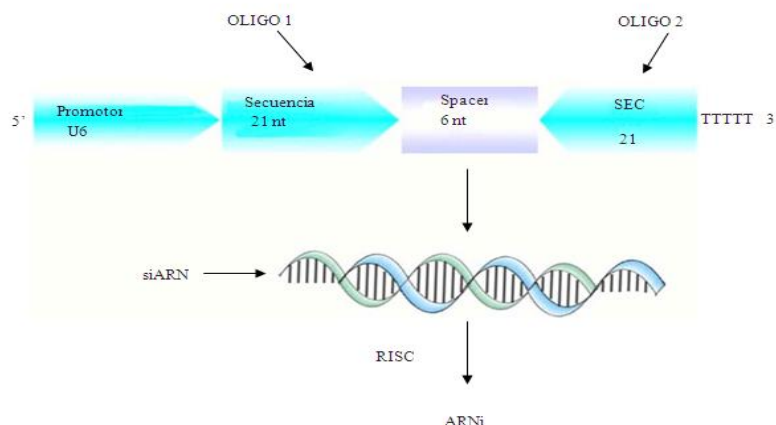
En la actualidad existen novedosas estrategias para introducir un siRNA en células de mamíferos. En un principio las células se transfectaban con siRNAs desnudos y se observaba un efecto de silenciamiento sobre el gen específico aunque, después de cierto tiempo, la expresión del gen se estabiliza a sus condiciones basales.

Por lo anterior se decidió utilizar siRNAs basados en vectores de DNA, es decir, un vector que generara siRNAs constantemente bajo el control de un promotor tejido específico, casi siempre el promotor U6 de humano.

Este promotor es necesario y específico para la generación de siRNAs, es una secuencia promotora para la RNA polimerasa III la cual genera RNAs pequeños y se despegan de la secuencia de DNA luego de encontrar una cola de poliT'. (Ver Figura 4).

Asimismo se han empleado vectores virales para infectar células humanas. Los retrovirus mostraron una buena infección de una amplia gama de células de mamíferos, pero el efecto únicamente se observa en células a las que inicialmente infectaban.

Posteriormente se utilizaron vectores adenovirales competentes a la replicación y virus oncolíticos que pueden llegar a capas más profundas dentro de los tumores. Además de los vectores virales se han empleado fusiones de siRNAs en liposomas o en complejos con polietilenimina (PEI), y las formas de introducirlos que se han utilizado son: vía intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, subcutánea, subretinal y electroporación.



**Figura 4.** Estrategia para la generación de siRNAs clonados en un vector de expresión. Hacia el extremo 5' se coloca un promotor U6, después la secuencia de 21-25 dirigida contra un mRNA blanco (oligo 1), una secuencia espaciadora, la misma secuencia seleccionada pero invertida (oligo 2, que al estar invertida es complementaria al oligo 1 y genera la estructura tipo tallo-asa característica de los siRNAs) y finalmente, una cola de al menos 5 timinas. La RNA polimerasa III transcribe esta secuencia y genera los siRNAs que son reconocidos por RISC para inducir el corte y degradación del mRNA blanco (8).

Todos estos métodos se estudian intensamente, ya que el éxito de una terapia con siRNAs depende de varios factores en los cuales se incluyen la protección de los siRNAs, la eficacia de la transfección, evitar efectos tóxicos o inespecíficos, la eficacia utilizando pequeñas cantidades de siRNAs y la posibilidad de aplicar diversos tratamientos contra distintas enfermedades.

Los retos futuros para que los siRNAs puedan ser empleados en la clínica están enfocados en la comprensión de la canalización y procesamiento del siRNA por los tejidos blanco, la evaluación de la estabilidad del siRNA, su vida media y los llamados efectos *off-target* y en la determinación de los métodos óptimos de liberación en los tejidos de interés.

En cuanto a la estabilidad del siRNA, cuya vida media es de unos cuantos minutos en plasma, se han estado evaluando modificaciones químicas como el 2'-fluoro (2'-F) pirimidinas que, a diferencia de siRNAs que sólo contienen 2'-OH, exhiben una vida

media prolongada en plasma (de minutos a días) sin reducir su capacidad para inhibir la expresión de genes en células de mamífero. En un principio, este silenciamiento genético se creyó que era específico. Sin embargo, en cuanto a los efectos *off-target* existen reportes que han sugerido que los siRNAs pueden tener efectos no específicos a nivel del mRNA y de la proteína. Por ejemplo, en un experimento realizado en células de mamífero en el 2004, se encontraron cambios significativos en los niveles de proteínas de genes que no estaban relacionados con el silenciamiento del gen blanco. Estos descubrimientos sugieren que los siRNAs pueden regular la expresión de blancos involuntarios. Por otro lado, podrían alterar las funciones reguladoras de algunos microRNAs celulares, además de que algunas secuencias específicas del siRNA pueden obstaculizar la incorporación de otros siRNAs. Lo recomendable es tener precaución en la interpretación de la función del gen y los fenotipos resultantes del RNAi. Es importante señalar que no está aún bien esclarecido cómo las células pueden hacer siRNAs (microRNAs) sin efectos *off-target* mientras que los siRNAs artificiales no pueden llegar a ser tan específicos. Una investigación indica que la razón podría ser la energía libre de unión de los primeros 8 nucleótidos en la región 5' del miRNA (8).

Los siRNAs pueden ser divididos en 2 grupos de acuerdo a los genes que silencian; el primer grupo involucra el silenciamiento de genes cuya expresión causan daño al propia organismo (genes virales, o genes mutados o resultantes de translocaciones cromosómicas), en este caso los siRNAs serán terapéuticos. En contraste, el segundo grupo involucra silenciar genes endógenos para observar su funcionamiento o su papel en el organismo. Cabe señalar que la estrategia de los siRNAs se basa en su asociación directa con RISC, sin la necesidad de ser identificados por Dicer (8).

### **1.9. Complicaciones comunes en el uso de RNAi**

El criterio importante que distingue a un éxito en la técnica de RNAi de un fallo es el tiempo necesario para reducir la expresión de proteínas por debajo del nivel de umbral que es fundamental para mantener la función normal de las proteínas. Esto es en gran parte determinada por la eficacia de los siRNA a la meta de mRNA de elección, pero, además, la estabilidad de la proteína es un factor crítico.

El tiempo necesario para reducir la expresión de la proteína debajo del nivel crítico, una vez que el RNA se degrada o la traducción se cierra, está determinada principalmente por la vida media de esa proteína. Como silenciar la expresión de proteínas estables pueden requerir periodos de incubación muy largos con siRNA, esto sólo se logra por la expresión estable de los siRNA y a periodos de incubación con RNAi que aumentan las posibilidades de efectos secundarios y la adaptación de una fracción cada vez mayor de las células de en esa población.

Normalmente, los experimentos de RNAi se realizan mediante la transferencia de siRNA en una población de células asincrónicas, y la desaparición de la proteína objeto de la investigación, así como la aparición del fenotipo posible, se toman como prueba de una efectiva estrategia de focalización. Sin embargo, los resultados de estos experimentos pueden ser motivo de preocupación por muchas razones. En primer lugar, es difícil descartar que el siRNA utilizado haya actuado estrictamente sobre los objetivos del gen seleccionado y no algún otro gen, ya sea actuando de buena fe como un siRNA que degrada el mRNA, o como miRNA para bloquear su traducción.

De hecho, ahora está claro que los desajustes sutiles son tolerados en un siRNA, y que la homología parcial puede ser suficiente para una eficaz orientación de los genes no deseados. Esto afecta la eficacia de la orientación, pero no suprime completamente la función de los siRNA. Por lo tanto, es muy probable que se silencien los genes adicionales por un determinado siRNA. Esto es comúnmente controlado por un siRNA independiente que se dirige a una región distinta en el gen de la elección, debido a que es poco probable que la meta del segundo siRNA tenga un objetivo similar al del siRNA original.

Otra complicación que perturba muchos enfoques del siRNA es el hecho de que los efectos secundarios pueden surgir debido a la depleción del producto de un gen específico, que se califican como una consecuencia primaria de la función deteriorada de genes. Un efecto secundario recientemente descrito es la activación de una respuesta de interferón similar esa a la descrita anteriormente con dsRNAs largos, pero los efectos secundarios más sutiles, también pueden ser invocados.

La depleción de un producto de los genes por RNAi se acumula con el tiempo, y parece probable que algunas células en una población dada alcanzaran un nivel crítico de expresión de proteína para alterar la función de las proteínas en una fase muy temprana en el curso de un experimento de RNAi. En contraste, otra fracción de las células puede tomar mucho más tiempo en alcanzar ese nivel umbral de expresión de proteínas, debajo del cual la función del gen es efectivamente bloqueada. Esta complicación se agrava por la variación en la producción de siRNA o captación entre las diferentes células en una población. En efecto, los fenotipos inducidos de siRNA se presentan a menudo en diferentes grados en las células de mamífero, lo que sugiere que la eficacia de RNAi varía según la cultura. Esto puede ser percibido como una ventaja, ya que a veces permite estudiar múltiples funciones de un gen en un solo gen.

Sin embargo, una vez que una célula carece de la función de un gen específico, puede degenerarse rápidamente, posiblemente dificultando la interpretación del experimento. Específicamente en los experimentos que se dirigen a la comprensión de la regulación de la división celular, las complicaciones que surgen como las células se someten a una división fallida después de una interferencia de una proteína del ciclo regulatorio de una célula importante.

Esto puede desencadenar un punto de control de una respuesta indirecta, catástrofe mitótica o el fracaso de la mitosis, de modo que las células empobrecidas acumulan todo tipo de defectos de secundarios. Los efectos de RNAi ocurren de forma asincrónica sobre las diferentes células en una población. Como consecuencia de ello, los efectos secundarios, adaptación y la toxicidad también se producirán de forma asincrónica, lo que dificulta poder identificar una ventana ideal para tener la oportunidad de realizar un experimento de RNAi interpretable. Esto se vuelve cada vez más difícil si el tiempo necesario para alcanzar ese umbral crítico de aumento de la función proteica porque hay una ineficiente estrategia de focalización, o cuando una proteína particularmente estable es estudiada.

Además, la expresión del gen sometido a investigación puede variar considerablemente en comparación de las diferentes células en esa población, para empezar. Esto es, por supuesto, sobre todo cierto para los genes que muestran un patrón de ciclo celular dependiente de la expresión. Como se mencionó anteriormente, los experimentos de RNAi son típicamente realizados por la transfección de una población asincrónica de células, y por lo tanto esto se puede esperar introducir una mayor variación en el calendario requerido para alterar la función del gen de una célula a otra en el esa población. Por supuesto, estas son bien conocidas complicaciones desde el punto de vista genético, y son consideraciones que deben hacerse cuando se trata de interpretar los resultados de un experimento de RNAi (29).

### **1.11. La ruta del RNAi en la genética de mamíferos**

Conocer y entender mejor el mecanismo del RNAi puede sin lugar a dudas, iluminar el oscuro camino que el ser humano transita a través de las enfermedades mortales; afortunadamente, los resultados por demás alentadores observados hasta nuestros días, colocan una luz a favor de la humanidad.

En experimentos basados en RNAi, una de las primeras decisiones que hay que tomar es cuál tipo de RNA, siRNA o miRNA habrá de utilizarse para activar la supresión. Las principales ventajas del siRNA son: su alta eficacia para la liberación de secuencias dentro de la célula, lo que resulta en concentraciones altas del gen silenciador, además de la gran disponibilidad comercial de siRNA prevalidados. Entre las limitaciones de los siRNA destaca el hecho de que sus efectos son transitorios y dependientes de la tasa de división celular, ya que las células de mamíferos no tienen mecanismos para amplificar y propagar el RNAi (como las plantas y *C. elegans*), además de que algunas son muy difíciles de transfectar y de que el proceso de transfección *per se* puede alterar la fisiología de la célula.

En el caso de los miRNA la inversión es mucho mayor, ya que es necesario diseñar oligonucleótidos para clonarlos y secuenciarlos, lo cual es indispensable para producir una construcción óptima.

Sin embargo, los miRNA son capaces de producir silenciamiento sostenido y expresarse abundantemente mediante transfección convencional o utilizando diversos vectores que permitan su integración estable en el genoma. Además, los vectores de expresión del miRNA pueden ser propagados indefinidamente.

Ambos se han utilizado para determinar la función de diversos genes *in vivo*, principalmente en ratones. La primera demostración del silenciamiento en animales adultos mediada por RNAi, se hizo mediante la represión del gen reportero de luciferasa, mediante la transfección de plásmidos con siRNA y miRNA en el hígado de un ratón. En estudios subsecuentes se introdujeron siRNA y miRNA en el hígado de un ratón. En estudios subsecuentes se introdujeron siRNA y miRNA a varias células de diferentes formas, como inyección de ácido nucleico desnudo o mediante lipofección inhibiendo la expresión de diversos genes blanco.

El silenciamiento de genes a largo plazo *in vivo* se ha demostrado produciendo mosaicismo genético y transferencia a la línea germinal. Por ejemplo, el crecimiento de un tumor modelo xenogénico puede atenuarse agregando a las células un casete de miRNA cuyo blanco sea el oncogén RAS, permitiendo que éste se active antes de reinyectar las células al animal. También se ha suprimido la expresión de genes germinales y sus órganos productores.

Algunos oligonucleótidos sintéticos suprimen el gen blanco de manera transmisible, basados en la acción de heredabilidad dominante de un casete de expresión de miRNA. Con el éxito de estas estrategias surgieron muchos experimentos que incluyeron inyecciones nucleares, creación de quimeras mediante células germinales sometidas a ingeniería genética, y por transgénesis mediante la inyección de lentivirus en huevos fertilizados. En la actualidad, esta tecnología ya permite la creación de animales con silenciamiento inducible de casi cualquier gen (10).

### **1.11. El RNAi como una herramienta de análisis genómico global**

Paradójicamente los miRNA pueden también utilizarse para el análisis genómico global a partir de estudios a pequeña escala. Recientemente se utilizó una biblioteca de estos RNA dirigida a la familia de enzimas de la desubicultinación, encontrado que el gen supresor de tumor CYLD (gen de susceptibilidad a cilindromatosis) suprime la actividad de NF- $\kappa$ B.

Este resultado originó diversas propuestas para el tratamiento de la cilindromatosis con fármacos ya existentes, y confirmó que los estudios genéticos no solamente generan avances prácticos en el tratamiento racional de enfermedades.

Las bibliotecas de siRNA pueden constituirse mediante síntesis química o por digestión enzimática de dsRNA largos. De manera alternativa, la construcción de varios vectores de expresión de miRNA que tenga cada uno un gen blanco, permite también la producción de bibliotecas.

Recientemente, dos grupos publicaron la producción de bibliotecas a partir de oligonucleótidos sintéticos que cubren aproximadamente 10,000 genes únicos. Otro grupo de investigación creó una biblioteca de miRNA mediante productos de PCR. Por otro lado, también existen métodos para construir bibliotecas de miRNA basadas en la manipulación del RNA complementario. Todo esto está en desarrollo y pronto veremos sus resultados.

Los análisis a gran escala con bibliotecas de siRNA, pueden realizarse por medio de microarreglos imprimiendo diferentes miRNA o siRNA sobre laminillas de sílice para realizar transfecciones inversas. Este tipo de transfecciones involucran a la deposición de complejos ácido nucleico-lípidos sobre una superficie sólida y las células que se plaquean sobre esta superficie “tomarán” el DNA o RNA encapsulado para regular la expresión o el silenciamiento del RNAm.



Otra manera de valorar los efectos del miRNA es por medio de una transfección *in situ*, seleccionando las células transfectadas en cultivo ya sea mediante citosinas o bien antibióticos y posteriormente realizar microarreglos de expresión para determinar la expresión diferencial en cada una de las células (10).

### **1.12. RNAi en el tratamiento y descubrimiento de nuevos fármacos**

Como hemos visto, el RNAi ha comenzado a cambiar los paradigmas hasta ahora existentes en el proceso del descubrimiento de nuevos fármacos. Con los métodos de análisis a gran escala que se mencionaron, el RNAi cobra gran importancia, ya que pueden enfocarse directamente a la búsqueda de los blancos de fármacos promisorios.

Sin embargo, desde que se descubrió por primera vez la utilización en células de mamíferos, se han realizado muchos estudios para utilizarlos en el tratamiento de enfermedades. Su eficacia en la terapéutica dependerá de la especificidad de la inhibición a la que el gen blanco es sometido. En tal caso, las posibles secuencias blanco para tratar enfermedades.

En tal caso, las posibles secuencias blanco para tratar enfermedades serían: oncogenes, genes supresores o incluso polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Además, hay grandes esperanzas de poder algún día utilizar el RNAi en el tratamiento de enfermedades virales como la hepatitis C y las infecciones por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), de lo cual hay resultados preliminares. No obstante, el gran potencial de esta técnica en terapéutica, debemos mantener en mente su posible toxicidad, cuyas consecuencias no estamos en condiciones de predecir.

Actualmente existen propuestas clínicas para utilizar miRNA sintéticos o vectores virales como tratamiento, pero ninguna ha sido aprobada (10).

### **1.13. Estrategias para el uso efectivo del RNAi**

En general hay dos tipos de ensayos: los *transitorios*, donde la expresión del gen se interfiere sólo temporalmente; y los *estables*, donde las células o el organismo son

permanentemente interferidos. En el primer caso suelen utilizarse los siRNA sintetizados químicamente, para el segundo se requiere que la célula incorpore a su genoma los elementos necesarios para fabricar una molécula de RNA de doble cadena que llegue hasta el citoplasma. Esto se logra a partir de vectores que producen shRNA (*small hairpin RNA*) o microRNA. Éstas son moléculas que forman una estructura del tipo tallo-asa (similar pero más sencillo que la de un microRNA), los cuales son procesados por Dicer y forman siRNA. El uso de microRNA resulta muy eficiente porque se utilizan moléculas producidas naturalmente en la célula; de esta manera se genera un proceso de silenciamiento más eficaz. Cuando se utiliza microRNA es común que se ocupe una secuencia equivalente al pre-microRNA, en donde el tallo que formará el microRNA maduro es cambiado por la secuencia que se desea interferir (10).

## CAPÍTULO II

### USOS DEL RNAi EN LA TERAPIA GÉNICA

Desafortunadamente todavía existen muchas enfermedades incurables. El panorama, para beneficio de muchos pacientes en el mundo, comienza a cambiar lenta pero prometedoramente, gracias al desarrollo de la genética molecular y al advenimiento de la medicina genómica.

Gracias a su potencia y su selectividad, el RNAi se ha convertido en el método para el silenciamiento de la expresión de genes específicos en células de mamíferos. El control de los genes asociados a enfermedades es una oportunidad para futuros terapéuticos. Básicamente todas las enfermedades humanas causadas por la actividad de uno o varios genes podrían ser tratadas por la intervención de RNAi. Esto incluye cáncer, enfermedades autoinmunes, desórdenes genéticos dominantes e infecciones virales. Además, como los miRNA pueden trabajar como supresores tumorales y oncogénicos, los miRNA endógenos pueden también convertirse en dianas terapéuticas.

Sin embargo el empleo de siRNA tiene algunas limitaciones como la activación del sistema inmunitario a través de la vía de los receptores TLR o el silenciamiento colateral de genes que no son gen diana (9).

#### **2.1. Enfermedades genéticas**

Una potente aplicación terapéutica del RNAi es el tratamiento de las enfermedades genéticas. Una iniciativa prometedora en esta dirección ha sido probada en estudios preliminares demostrando que el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en transcritos de alelos mutados puede ser usado como diana selectiva para el RNAi.

Sin embargo, las enfermedades causadas por proteínas con poliglutaminas son difíciles de paliar porque son codificadas por transcritos que contienen elevadas repeticiones de CAG en su secuencia, por lo que no pueden ser dianas específicas de siRNA, ya que numerosos transcritos normales contienen secuencias ricas en CAG.

El desafío es encontrar una combinación siRNA/SNP que sea altamente selectiva. Esto puede ser llevado a cabo por el análisis sistemático de siRNA, donde nucleótidos polimórficos de mRNA son complementarios a la región media de siRNA. En algunos casos el siRNA sólo degrada selectivamente los transcritos mutantes, dejando los transcritos *wild type* intactos, aunque únicamente tengan un solo *mismatch*.

Otra aplicación adicional de siRNA/SNP ha sido publicada en estudios sobre la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) causada por la mutación en el gen de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (*SOD1*). Dado que el gen *wild-type SOD1* tiene importantes funciones, será muy revelante eliminar únicamente la expresión de los transcritos de los alelos mutantes. En este caso las transiciones purina → purina (A·T ↔ G·C) en las posiciones 10 y 16 en el extremo 5' de la hebra guía proporciona selectividad. Los investigadores fueron capaces de conseguir una degradación selectiva del alelo mutante, proporcionando una potente aplicación terapéutica para el tratamiento del ELA.

Así pues, se está aplicando la tecnología de RNAi como terapia de enfermedades neurodegenerativas como Huntington, Ataxia, Alzheimer, entre otras (9).

### **2.1.1. Esclerosis lateral amiotrófica**

La esclerosis lateral amiotrófica es la forma más común de enfermedad progresiva de la neurona motora. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa devastadora por sus manifestaciones clínicas.

La muerte de las neuronas motoras periféricas lleva a la degeneración y a la atrofia consecuentemente de las fibras musculares, por lo que aparece una marcada debilidad muscular sin alteraciones sensoriales y sin compromiso de las funciones cognitivas. Los varones son afectados con mayor frecuencia que las mujeres y las manifestaciones clínicas aparecen habitualmente después de los cincuenta años.

En cerca de 10% de los casos la enfermedad es hereditaria, con un patrón de herencia autonómico dominante, aunque existe una forma juvenil autosómica recesiva. Debe hacerse diagnóstico diferencial también con la atrofia muscular espinobulbar, o enfermedad de Kennedy, que es ligada al cromosoma X, corresponde a la amplificación

del trinucleótido CAG en el primer exón del gen para el receptor de los andrógenos, y en la cual no hay signos de hiperreflexia o espasticidad.

Se han encontrado mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), localizado en el cromosoma 21 (21q22) y estudios de ligamento revelan genes relacionados con este padecimiento localizados en el cromosoma 2 y en el cromosoma 11.

La enfermedad es progresiva y la muerte ocurre en tres a cinco años, usualmente por parálisis respiratoria. En la actualidad no existe tratamiento efectivo para este padecimiento.

Por esta razón resultan muy alentadores los resultados obtenidos en modelos murinos de este trastorno con mutaciones en el gen de la *SOD1*. La primera aproximación exitosa consistió en administrar, mediante terapia génica, factores neurotróficos en los músculos afectados.

Los resultados más promisorios, sin embargo, se han alcanzado utilizando las nuevas metodologías de RNAi. En este caso se utilizan secuencias cortas de RNA, de 21 a 23 nucleótidos, que se unen al RNA mensajero (RNAm) blanco, el cual ha sido transcrito del gen que codifica para la *SOD1*, e impide de esta manera que se produzca la proteína mutada (12).

Los silenciadores de los genes pueden ser inyectados directamente en los ventrículos y así se han logrado resultados satisfactorios tanto en ratones como en ratas, y se está aplicando actualmente en las células de la piel de pacientes con la forma familiar de esclerosis lateral amiotrófica.

Se ha reportado también, evidencia exitosa en modelos animales con mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa (*SOD1*), en los cuales siRNAs introducidos mediante vectores virales inducen una reducción de la expresión de *SOD1* y aumenten la supervivencia de neuronas motoras. Lo anterior representa una aproximación de terapia para desórdenes genéticos caracterizados por propiedades tóxicas. Uno de los retos para este tratamiento es el inhibir específicamente el alelo mutado y mantener la

función del alelo normal, para estudiar esto, el grupo Xu realizó experimentos con ratones transgénicos, con lo cuales comprobaron que los RNAi silencian al gen de manera alelo-específica, lo cual representa un beneficio para la terapia *in vivo* (13).

### **2.1.2. Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) pertenece a un grupo de condiciones llamadas trastornos del sistema motor, que son el resultado de la pérdida de células productoras de dopamina cerebral. Los cuatro principales síntomas de la EP son el temblor o temblor en las manos, brazos, piernas, mandíbula y cara, rigidez, o la rigidez de las extremidades y el tronco; bradicinesia o lentitud de movimiento, y la inestabilidad postural, o la alteración del equilibrio y la coordinación.

Los resultados terapéuticos duraderos de silenciamiento del gen alfa-sinucleína, cuando los siRNA, las moléculas que median RNAi, son administrados por la entrega directa al SNC en ratones. Alfa-sinucleína se cree que desempeña un papel central en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, donde la acumulación de exceso de la proteína alfa-sinucleína se ha asociado con la causa y/o vía de la enfermedad.

“Estos datos se suman a un creciente cuerpo de conocimientos sobre las aplicaciones de la terapéutica de RNAi para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas”, dijo David Bumcrot, Ph. D., Director, Investigación en Alnylam, una compañía biofarmacéutica de desarrollo de nuevas terapias basadas en la interferencia de RNA o RNAi. “Los expertos creen que la reducción de los niveles de alfa-sinucleína en el cerebro puede ralentizar o incluso detener la progresión de la enfermedad de Parkinson y sus síntomas asociados.

Hasta la fecha no se han identificado las drogas que son capaces de reducir los niveles de alfa-sinucleína en el cerebro.

Los nuevos enfoques como el RNAi puede allanar el camino para la enfermedad de nuevos medicamentos modificadores de la enfermedad de Parkinson basadas en la administración directa de siRNA para el sistema nervioso central de los pacientes con esta enfermedad debilitante e incurable”.

Los datos publicados (Lewis, *et al.*, *Molecular Neurodegeneration* 2008, 3:19 doi: 10.1186/1750-1326-3-19) demostraron que modificar químicamente los siRNAs con orientación alfa-sinucleína para su silenciamiento, se obtiene un resultado significativo y duradero en los genes en los ratones. Una reducción de aproximadamente el 70% en niveles de alfa-sinucleína se observó en los ratones tratados, en comparación con los controles. Los resultados también mostraron que el silenciamiento de RNAi de la alfa-sinucleína se prolongó durante tres semanas y que el efecto no se limita al sitio de entrega inmediata.

En estos estudios preliminares, la sinucleína-siRNA específica resultó ser bien tolerada en el cerebro después de la administración directa en el SNC. Estos resultados sugieren que la terapéutica de RNAi puede llegar a ser útil en la reducción de la sobre-expresión de alfa-sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson.

Este estudio fue realizado en colaboración con la Clínica Mayo y financiado por la Fundación Mayo para la Educación Médica e Investigaciones y la Fundación Michael J. Fox (MJFF) con un subsidio “Objetivo de validación”, premiada en 2005 (13).

### **2.1.3. Huntington y otras enfermedades neurodegenerativas**

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo con heredabilidad autosómica dominante que se caracteriza por la mutación del gen humano *htt*, que codifica para la huntingtina, la cual forma agregados intranucleares neuronales encontrados principalmente en neuronas corticales y estriatales causando la muerte.

Se sabe que un solo exón mutante de *htt* es suficiente para causar la enfermedad vía un mecanismo de obtención de función, por lo que se ha propuesto el uso de siRNAs para disminuir la expresión del gen *htt* mutado como una estrategia terapéutica.

La introducción de siRNAs en ratones transgénicos HD (*Huntington's Disease*) después del nacimiento ha dado como resultado una disminución en la producción de huntingtina mutada, así como efectos fenotípicos característicos de la enfermedad, demostrando así una posible terapia *in vivo*.

Resultados de informes que tienen implicaciones para la enfermedad de Huntington y el ARN inhibidoras, un estudio en la edición del 8 de abril de 2008, en línea de las Actas de la Academia Nacional de Ciencias se suma al cuerpo de evidencia que muestra que en lo que se refiere a RNAi, definitivamente puede ser demasiado de algo bueno.

El estudio de PNAS es parte de un programa preclínico de la enfermedad de Huntington. Su objetivo original, la autora principal Beverly Davidson dijo que su objetivo, es extender los resultados anteriores que el uso de ARN de horquilla corta (shRNAs) para derribar la huntingtina, la proteína mutante que está en la raíz de la enfermedad de Huntington, y que podría conducir a mejoras en el comportamiento los síntomas. Sin embargo al hacer un shRNA más potente, se descubrió que el cerebro no lo tolera muy bien.

Los estudios de laboratorio mencionados, mostraron que Davidson emitió AAV-genes fueron capaces de alcanzar genes diana en el cerebro del ratón, y posteriormente mejorar el déficit de conducta y la patología de enfermedades de repetición de poliglutamina como la Huntington. Estos resultados prometedores han dado lugar a colaboraciones con la terapia de genes SSV con la compañía Targeted Genetics y Sirna Therapeutics, con el objetivo de avanzar en la terapéutica con AAV basada en RNAi para la HD en la clínica.

Sus trabajos antes de Huntington se basan en un modelo de ratón transgénico que expresa un fragmento del gen humano de la huntingtina con una expansión de tripletes.

Sin embargo, como la shRNA en esos estudios fue dirigida específicamente contra el gen *htt* en humanos, dejó copias en los genes de huntingtina no orientados de los ratones, los estudios actuales han sido diseñados para evaluar la seguridad de derribar todas las copias del gen de la huntingtina en un ratón.

Esto es importante para el desarrollo de una terapéutica de RNAi para HD en el hombre, un pequeño RNA dirigido a la expansión de tripletes muy estructurados es poco probable que sea eficaz, y dado que el alelo *htt* mutante no está asociado con un



polimorfismo común en el RNAm de *htt* que facilite una discriminación entre huntingtina mutante y de tipo salvaje. Esta cuestión es también motivo de especial preocupación ya que el gen de la huntingtina se considera esencial durante el desarrollo temprano de los mamíferos y se sabe poco acerca de su obligación en el cerebro adulto.

Por esta razón, se realizó otro experimento (*McBride y compañeros*) esta vez se eligió un modelo de ratón diferente, así cuando una expansión de tripletes se ha insertado en uno de los alelos *htt* existentes, el ratón tiene la ventaja de que también preserva el patrón de expresión natural de *htt*.

El efecto es alentador, un 50-60% de los ratones no presentaron ningún efecto secundario-específico de manera evidente. Tomando en cuenta que no todas las neuronas son transducidas y que las células no neuronales también pueden expresar algunas *htt*, ese 50-60% implica que una “caída” muy eficiente de *htt* mutante se puede lograr en un conjunto de neuronas (14).

#### **2.1.4. Ataxia Espinocerebelar tipo I**

El potencial del RNAi como opción terapéutica para las enfermedades neurológicas fue observado por primera vez en un modelo de ratón con ataxia espinocerebelar tipo I, la cual es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante causada por la expansión de una secuencia de poliglutamina en la proteína ataxina I. Para silenciar la expresión de dicha proteína, se probaron varios plásmidos que contenían secuencias de “hairpin RNA” complementarias a la de la ataxina I humana. Dos secuencias flanquearon las regiones repetitivas de CAG codificantes para la glutamina disminuyendo los niveles de ataxina I.

Estas secuencias de shRNA fueron sucesivamente insertadas dentro de virus adeno-asociados recombinantes para determinar si el siRNA ataxina I específico tenía un efecto biológico en el modelo de ratón transgénico para ataxia cerebelar tipo I.

La inyección intracerebelar tuvo como resultado un aumento de la coordinación motora, mejoría de las neuropatías encontradas y una pérdida completa de las inclusiones de ataxina I en células de Purkinje demostrando un evidente beneficio terapéutico (15).

### **2.1.5. Ataxia cerebelar tipo III**

Conocida como enfermedad de Machado-Joseph, es también una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante que resulta de repeticiones expandidas CAG en el gen de la ataxina III. En estudios realizados para tratar de silenciar el gen que codifica para la ataxina III alterado con un siRNA, se obtuvo silenciamiento de ambos alelos, el portador de la enfermedad y el normal. Luego de varios intentos, se desarrolló un siRNA sintético específico para la región del gen alterado que contiene la mutación en la posición 8 el cual inhibía de forma específica el alelo alterado (16).

### **2.1.6. Enfermedad de Alzheimer**

La demencia tipo Alzheimer es una enfermedad progresiva, degenerativa e irreversible de la corteza cerebral que provoca el deterioro de la memoria, orientación, juicio, lenguaje, personalidad y conducta, interfiriendo con la capacidad para realizar las actividades de la vida diaria. Evoluciona por etapas; el deterioro es insidioso y lento. La mayoría de las víctimas de esta enfermedad son personas mayores de 65 años; sin embargo, puede atacar a edades mucho más tempranas.

Es muy difícil diagnosticarla, ya que su comienzo es lento, casi imperceptible y con frecuencia se atribuye a otras enfermedades. Afecta al cerebro, borrando la sabiduría adquirida a través de los años.

Su origen es incierto, y afecta a cualquier persona independientemente de sexo, escolaridad, ocupación, raza, clase social, etc. Su comienzo es impredecible y evoluciona de manera diferente en cada caso (28).

Entre las causas de esta patología se encuentran la formación de ovillos neurofibrilares y la acumulación de  $\beta$ -amiloide en placas.

Las investigaciones en este campo se han retrasado debido a la gran cantidad de posibles dianas terapéuticas, entre las cuales se pueden mencionar varios subtipos de proteínas precursoras amiloide, las proteínas tau,  $\beta$  secretasas, entre otras (17).

## 2.2. Enfermedades metabólicas

Actualmente se utiliza el RNAi para estudiar el papel de diferentes genes en la patogénesis de la diabetes y la obesidad. Uno de los primeros intentos para usar la tecnología del RNAi en enfermedades metabólicas fue para investigar las vías de señalización de la insulina. La señalización de insulina es un mecanismo requerido para la homeostasis de glucosa. Dentro de las principales vías metabólicas reguladas por insulina se encuentra la inhibición de la gluconeogénesis en hígado y la estimulación del transporte de glucosa en músculo y tejido adiposo.

Otro grupo diseñó la estrategia de inducir silenciamiento postranscripcional del gen para *PEPCK*, la enzima que controla la gluconeogénesis utilizando siRNAs clonados en vector, obteniendo una disminución considerable de los niveles de glucosa en sangre, mejorando la tolerancia a glucosa, así como la disminución de ácidos grasos y triglicéridos en ratones. Estos datos validan a la *PEPCK* como un blanco para la terapia génica de la diabetes.

Un enfoque diferente fue a través de la administración de siRNAs dirigidos contra el RNA mensajero de la apolipoproteína B (Apo B) en hígado, y se obtuvo una disminución en los niveles de dicha proteína en plasma. Apo B es una proteína involucrada en el metabolismo del colesterol.

Las concentraciones en sangre de dicha proteína están relacionadas con las concentraciones de colesterol y los altos niveles de ambos se asocian con un alto riesgo en las coronarias.

Además, se observó que la inyección intravenosa de siRNAs contra Apo B resultó en una disminución de los niveles de colesterol en sangre comparado con los resultados observados en ratones, en el cual el gen de la apolipoproteína había sido deletado. La saga de ejemplos exitosos de siRNAs terapéuticos fue el de la

administración intravenosa de siRNAs modificados en ratones con tumores xenoinjertados. En este modelo, un grupo muy amplio de investigación inhibió el mensajero de la apolipoproteína B en el hígado y el yeyuno; observando una disminución del nivel del plasma de Apo B y reducción de los niveles de colesterol-total, permitiendo observar la estabilidad de los siRNAs y su eficiencia en un sistema *in vivo*. Estos resultados sugieren que el RNAi tiene el potencial para convertirse en una nueva terapia para el tratamiento de enfermedades metabólicas (9).

### **2.3. Enfermedades virales**

El RNAi está implicado en la inhibición de virus y el silenciamiento de transposones en plantas, insectos, hongos y nematodos mediante siRNA. Estos siRNA se asocian con RISC y se unen a la diana de RNA viral para silenciarlo. Además muchas evidencias sugieren que el RNAi también tiene un papel importante en los mecanismos de defensa antivirales en células animales. Por ejemplo el virus de estomatitis vesicular (VSV) es inhibido por las miRNA celulares miR-24 y miR-93. La expresión de ambas es reducida en ratones deficientes de Dicer causando un fuerte incremento de la replicación de VSV.

No obstante, hay más formas de crear siRNA. Muchos virus producen en alguna fase de su ciclo de infección RNAs de doble cadena. A partir de estos dsRNAs se producen siRNAs con secuencias del virus que promueven la degradación de RNAs virales, lo que conduce a una limitación en la acumulación y dispersión del virus dentro del organismo huésped.

Las posibles fuentes de producción de dsRNA a partir del virus son diversas. Los virus cuyo genoma está constituido por RNA, producen durante la replicación RNAs complementarios al RNA viral, que sirven de molde para la síntesis de nuevos RNAs virales. Estos RNAs de ambas polaridades forman de manera transitoria dsRNAs, denominados intermediarios replicativos, que probablemente son reconocidos por la célula como inductores de silenciamiento. Otros virus, cuyo genoma está constituido por DNA, pueden formar dsRNA durante la transcripción de sus RNA mensajeros. Es posible incluso que se produzcan dsRNAs a partir de la acción de enzimas RDR del organismo huésped sobre el RNA viral.

Los viroides, constituidos únicamente por un RNA circular que no codifica proteínas, podrían inducir silenciamiento debido a la síntesis de un RNA complementario al RNA genómico durante su replicación, o a partir de porciones de dsRNA que se formarían en zonas autocomplementarias de su RNA. Al igual que las posibles fuentes de dsRNA son variables dependiendo del tipo de virus, las rutas de silenciamiento por RNA que intervienen en la defensa antiviral podrían también ser distintas para cada tipo de virus.

La defensa frente a virus basada en silenciamiento por RNA tiene como principal ventaja su adaptabilidad, ya que la célula reconoce un aspecto intrínseco a la infección viral, como es la producción de dsRNA, e inicia una defensa cuya especificidad viene determinada por la propia secuencia de nucleótidos del virus (17).

### **2.3.1. Mecanismos de contradefensa de los virus**

A pesar del papel que juega el silenciamiento por RNA como defensa antiviral es evidente que los virus son capaces de infectar sus plantas huéspedes. Para ello, los virus han desarrollado mecanismos de contradefensa frente al silenciamiento por RNA. Algunos de estos mecanismos tratan de eludir el silenciamiento, por ejemplo llevando a cabo la replicación viral en vesículas membranosas, aisladas de la maquinaria de silenciamiento. Otros virus mutan muy rápidamente la secuencia diana (mutaciones puntuales, deleciones o inserciones) durante la infección, con lo que el silenciamiento ve reducida su capacidad de hacer diana en el RNA viral.

Las mutaciones también pueden ocurrir fuera de la secuencia diana induciendo un cambio de estructura que produce la inaccesibilidad del complejo RISC.

Otro método es la capacidad de suprimir activamente el mecanismo de silenciamiento por RNA a través de proteínas codificadas en su genoma. Se han identificado un gran número de proteínas, mayoritariamente de virus de plantas, capaces de suprimir silenciamiento. Algunas de las estrategias a seguir por estas proteínas son la oclusión de la secuencia diana mediante su unión, la inhibición de Dicer u otros componentes del RNAi e incluso el “secuestro” de siRNA. Además, estas proteínas suelen ser factores de patogenicidad necesarios para la correcta acumulación y-

propagación del virus, lo que confirma la necesidad del virus de suprimir el silenciamiento por RNA para poder infectar a su huésped.

Un último mecanismo consiste en la competencia de los RNAs virales con el RNAi por la unión a Dicer o RISC.

Las consecuencias para el mecanismo de silenciamiento por RNA varían dependiendo del modo de acción del supresor en cuestión. La mayoría son capaces de impedir o reducir la acción del silenciamiento en el propio tejido donde se expresa el supresor. Otras, no impiden el silenciamiento en el propio tejido, sino que interfieren con la producción o exportación de la señal que inicia el silenciamiento en órganos adyacentes, lo que podría favorecer la dispersión del virus (19).

### **2.3.2. RNAi para VHB**

Virus de la hepatitis B (VHB) es todavía un problema de salud en todo el mundo. Hay unos 400 millones de pacientes crónicos infectados por el VHB en todo el mundo, especialmente en China, donde la tasa de infección es tan alta como del 9,8% y más de un millón de personas mueren de insuficiencia hepática o cirrosis hepática HBV-asociados y el carcinoma hepatocelular (CHC) cada año. Los intentos de tratamiento de las infecciones crónicas han tenido sólo un éxito limitado. Debido a los efectos de la baja eficacia o secundarios de los fármacos actuales y la aparición de mutaciones del VHB resistentes a los medicamentos, sólo un 20% de los pacientes se benefician de la terapia de combinación con interferón  $\alpha$  y análogos de nucleósidos como lamidivina, entecavir y adefovir dipivoxil. Por lo tanto, hay una necesidad urgente de desarrollar una nueva estrategia terapéutica eficaz que inhiba la replicación del VHB.

El virión de VHB consta de un sobre y una nucleocápside que contiene una doble hebra parcialmente circular de ADN de 3,2 kb, que se reproduce a través de un RNA intermediario. Estudios recientes han demostrado que la interferencia de RNA, que puede ser inducido en células de mamíferos por RNA de horquilla corta (shRNAs), es un mecanismo de vigilancia conservado evolutivamente que responde a la doble cadena de RNA (dsRNAs) de la secuencia-específica posteriores al silenciamiento transcripcional de genes homólogos.

Es muy importante para el tratamiento de miras primaria, que tienen funciones para la regulación de la expresión génica, y por tanto, la inhibición de la replicación de VHB. También se ha demostrado que la orientación shRNA del genoma puede inhibir la replicación del VHC.

Estudios publicados *in vivo* de la transfección hidrodinámica han demostrado que la entrega simultánea de los plásmidos de expresión VHB y VHB-shRNA sintéticos específicos (o shRNA que expresan las construcciones) en el hígado del ratón pueden prevenir la inducción de la expresión génica y la replicación del VHB.

Las investigaciones pioneras han producido el primer tratamiento exitoso con RNAi de una enfermedad virológica en un animal: la hepatitis en ratas. Estudios realizados por Judy Lieberman, MD, (*Inmune Disease Institute, Harvard Medical School*) y su equipo silenciaron el gen *fas* el cual está involucrado en casi todos los tipos de hepatitis. Esto les brindó protección contra la muerte de células hepáticas (cirrosis) durante un período hasta de diez días con un solo tratamiento. El gen *fas* desencadena la muerte celular. Así pues, al desactivar el gen *fas* y parar la muerte celular se tradujo en una mayor supervivencia para las ratas con hepatitis. Las ratas que no fueron tratadas murieron de hepatitis en los tres días siguientes, mientras que el 82% de las ratas tratadas con RNAi sobrevivieron con hígados normales. Sus células hepáticas estuvieron protegidas hasta por diez días. El efecto del tratamiento comenzó a desgastarse después de 14 días y desapareció por completo después de 21 días (19).

### **2.3.3. RNAi como terapia para VIH**

El RNAi ha despertado el interés de los investigadores del SIDA, ya que tiene el potencial—tanto a largo como a corto plazo—de mejorar significativamente el tratamiento de la enfermedad del VIH.

En el largo plazo, los científicos creen que se podrá llegar a enviar pequeñas porciones de ARN a las células con el fin de evitar la reproducción del VIH.

Los científicos creen también que se puede intervenir en el corto plazo, evitando que las células CD4 produzcan un receptor superficial que requiere el VIH para poder infectar las células.

El VIH utiliza proteínas de la superficie de las células inmunológicas, como el CCR5, con el fin de infectar las células. La terapia RNAi mediante siRNAs orientada a bloquear este proceso tendría como objetivo el gen en una célula inmunológica responsable de producir el CCR5. En este caso, el siRNA actúa como un gen “falso” que concuerda exactamente con el gen del CCR5 que es el objetivo del virus. Cuando el gen del CCR5 comienza a producir la proteína CCR5, también crea un conjunto de instrucciones que es el CCR5 o mRNA. El gen falso se pega al mRNA y lo silencia antes de que los mensajes puedan ser recibidos. Una vez que los mensajes son silenciados, el siRNA busca más mRNA y silencia más mensajes, parando la producción de más CCR5. En consecuencia, deja de producirse una importante proteína que es necesaria para el VIH, incapacitando gravemente su habilidad de infectar la célula.

El CCR5 es considerado un objetivo principal de la terapia RNAi porque, hasta ahora, su ausencia no parece tener ningún efecto en la salud humana. Al eliminarse el CCR5 también puede disminuir el número de células en las que podría entrar el VIH con la esperanza de que no haya muchos efectos secundarios para la persona. En el reporte de un estudio de laboratorio reciente, la actividad del VIH sobre un macrófago, se silenció mediante siRNAs hasta durante tres semanas.

La terapia RNAi que está diseñada para suspender la reproducción del VIH una vez que éste ingresa en una célula va a requerir que el gen “falso” concuerde exactamente con el gen del VIH que se tiene como objetivo para silenciar. Puesto que el VIH produce copias inexactas de sí mismo (hace mutaciones) cada vez que se reproduce, tener como objetivo directo los genes del VIH puede ser un gran reto para el RNAi. Podría haber una propensión a desarrollar el mismo tipo de problemas de resistencia que se han observado con otros medicamentos contra el VIH. Sin embargo, en los estudios de laboratorio los siRNAs tuvieron como objetivo los genes que pueden bloquear más fácilmente la reproducción del VIH.

Los mensajeros RNA producidos por cualquier gen del VIH también son posibles objetivos de la terapia RNAi. Los experimentos han mostrado que los genes *tat*, *rev*, *gag* y *pol* del VIH son también posibles objetivos. El RNAi parece ser eficaz durante-



más tiempo y puede seguir teniendo como objetivos virus una y otra vez. En los tubos de ensayo, un tratamiento podría tener resultados hasta por diez días.

Todavía existen retos que afrontar en el proceso mediante el cual los investigadores pasan de las ratas a los hombres. Es de importancia crítica encontrar los genes correctos que habrán de ser el objetivo de esta terapia. Todavía no se sabe como se llevará la terapia RNAi hasta las células que lo necesitan. Además, los efectos a largo y a corto plazo de la terapia RNAi son casi totalmente desconocidos, pero seguramente despertarán inquietudes similares a las de las otras terapias genéticas. Entre ellas están el riesgo de crecimiento anormal de células (cáncer) y los métodos que se utilizan para introducir los genes en las células mRNA (por lo general mediante otros virus).

Los posibles beneficios de tratar el VIH con el uso de siRNAs son muy esperanzadores. Los efectos de larga duración que se sospechan del RNAi podrían disminuir las exigencias de una terapia diaria. Aunque seguramente al comienzo va a investigarse la terapia RNAi que tenga como objetivo los genes del VIH en conjunto con los otros medicamentos antirretrovirales, es posible imaginar un régimen cuyo nuevo (o único) medicamento se tome solamente una o dos veces al mes.

Además, la terapia RNAi puede ofrecer protección a células infectadas con el VIH que no estén produciendo activamente nuevos virus. Se cree que estos son depósitos de reserva que guarda el VIH para extender posteriormente su infección. Si estas células comienzan a producir virus de nuevo—o en el momento en que lo hagan—los siRNAs ya presentes en el torrente sanguíneo deberán poner de inmediato como objetivo y silenciar la actividad del VIH.

La terapia RNAi dirigida a los genes de un virus es muy probable que no produzca efectos tóxicos, puesto que estos genes no crean productos que sean necesarios para que una persona pueda vivir. Adicionalmente, debido a que existen muchos objetivos posibles para las RNAi—quizás todos los genes del VIH a la vez—las estrategias con más de una táctica RNAi podrían silenciar la actividad del VIH por períodos más extensos (18).

## 2.4. Cáncer

El cáncer es un término que se utiliza para las enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden propagarse a otras partes del cuerpo a través de la sangre y los sistemas linfáticos.

El cáncer no es sólo una enfermedad sino muchas enfermedades. Hay más de 100 tipos diferentes de cáncer. La mayoría de los cánceres son nombrados por el órgano o tipo de célula en el que empiezan a - por ejemplo, el cáncer que comienza en el colon se denomina cáncer de colon, cáncer que comienza en las células basales de la piel llamado carcinoma de células basales.

Los miRNAs están relacionados con importantes procesos homeostáticos como: proliferación y muerte celular. La desregulación de la que es un rasgo importante en la progresión del cáncer. Esto sugiere que la expresión aberrante de miRNAs probablemente tiene un rol en el desarrollo del cáncer.

Se descubrió que dos genes de miRNA, *miR-16* y *miR-15*, son localizados en una región del cromosoma 13 que es eliminado en más del 65% de pacientes con leucemia linfocítica crónica.

El vínculo de miRNA con el cáncer se vio reforzado por el descubrimiento de que la posición genómica del miRNA parece no ser al azar, y que un número significativo de genes miRNA se localizan en sitios frágiles (zonas inestables que han demostrado ser útiles para promover la inestabilidad del DNA en las células cancerosas). O regiones genómicas que se han vinculado al cáncer (27).

### 2.4.1. Cáncer de mama

Varios estudios han demostrado que los únicos perfiles de expresión de miRNA están presentes en un importante número de cánceres como el de mama, de pulmón, de esófago, cáncer de próstata y de páncreas. Se demostró que la diferencia de perfiles de expresión de miRNA de solo 15 miRNAs podría distinguir el tejido tumoral del normal, sin error, en 76 tejidos malignos y 10 muestras de tejido normal de seno.

Cinco miRNAs: *miR-10b*, *miR-125b*, *miR-145*, *miR-21* y *miR-155* resultaron ser los más sistemáticamente desregulados, con regulación a la baja de *miR-10b*, *miR-125b* y *miR-145* y la regulación a la alza de *miR-21* y *miR-155* visto en el tejido maligno. Por otra parte, la expresión diferencial de los miRNAs también actuó como marcador importante de características patológicas como la etapa del tumor, la capacidad de proliferación y la invasión vascular.

La desregulación de la *miR-145* y *miR-21*, ambos de los cuales forman parte del subgrupo de clasificación de los miRNAs de tejido tumoral han demostrado estar asociados con la progresión tumoral. La reducción de la expresión de *let-7*, se asoció con metástasis en los ganglios linfáticos y aumento de la capacidad de proliferación, lo que sugiere un papel para estos miRNAs en la progresión del cáncer y su pronóstico.

Un posible papel de los miRNAs en la metástasis del cáncer de mama también se ha puesto de relieve. Seis miRNAs demostraron ser regulados a la baja en una línea celular de cáncer metastásico de mama. La regulación positiva de tres de estos miRNAs (*miR-335*, *miR-126* y *miR-206*) se observó en la disminución de la metástasis a pulmón y hueso en un modelo de ratón de la enfermedad, lo que indica un papel represor metástasis. Esto también se observó *in vivo*, Con una expresión reducida de *miR-335* y *miR-126* en tumores primarios resultantes en la metástasis pobre supervivencia libre.

Más recientemente, se analizaron 93 tumores de mama humanos. Los datos obtenidos permiten la clasificación de tejido tumoral en subtipos (Luminal A, Luminal B, basal-like y SU<sub>2</sub> +), Basado en la expresión diferencial de miRNA. En estos estudios también se informó de una correlación entre la desregulación miRNA mundial y ER + y ER-tipo de tumor en las biopsias de cáncer de mama. Curiosamente, los autores fueron capaces de clasificar los tumores ErbB2 + en dos subgrupos clínicos (ErbB2 + / ER-y ErbB2 + / ER +) basados en la expresión diferencial de miRNA, destacando el posible papel de los miRNAs en el diagnóstico de cáncer y de subtipos de cáncer.

El hecho de que los perfiles de expresión de miRNA pueden clasificarse por subtipo tumoral tiene importantes implicaciones, ya que pueden ser útiles como herramientas de diagnóstico en el futuro. En la actualidad, el curso del tratamiento del cáncer de mama está determinado por el estado del receptor ErbB2.

Por lo tanto la clasificación de los subtipos de perfiles de miRNA pueden ser importantes para determinar el tratamiento más eficaz (21).

#### **2.4.2. Cáncer de pulmón**

Resultados similares se han observado en estudios de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), demostrando la expresión diferencial de 43 miRNAs en el tumor *frente* al tejido normal. Con el análisis de los datos también se identificó un único perfil de expresión de miRNA al discriminar dos subtipos clínicos (carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma) de CPNM, con seis miRNAs comunes a los dos subtipos y seis miRNAs expresados diferencialmente. Cinco miRNAs expresados diferencialmente en el tejido tumoral versus normal (*miR-155*, *miR-17-3p*, *let-7a-2*, *miR-145*, *miR-21*) también se muestran para indicar el pronóstico, con sobreexpresión de *miR-155* o de no expresión de *let-7a-2*. La expresión de *let-7* es alterado en el tejido NSCLC, indicando un posible papel en la carcinogénesis. Esto se corrobora por la evidencia de que la inducción inhibe el crecimiento tanto de *in vitro* como *in vivo*. Dos estudios recientes han demostrado reducir el crecimiento tumoral en un modelo murino (qué es) de cáncer de pulmón en la inducción de *let-7*, lo que indica un papel importante en la progresión de la enfermedad.

Un papel para la *miR-126* en la prevención de la invasión también ha sido demostrado en el cáncer de pulmón. *miR-126* al ser subexpresado en tumores de pulmón. La inducción de *miR-126* en una línea celular de cáncer de pulmón (H1703) redujo la invasión y migración común de lo que sugiere un papel supresor de la metástasis para *miR-126* (21).

#### **2.4.3. Cáncer de próstata**

Varios estudios han identificado un determinado perfil de expresión miRNA en el cáncer de próstata. Fueron perfilados 480 miRNAs en 10 tejidos benignos y 16 de tejidos malignos de próstata, 85 de los cuales resultaron ser expresada en malignos y / o el tejido benigno. Setenta y seis de estos miRNAs se subexpresaron en el tejido canceroso. Del mismo modo, se encontró que 51 de 319 miRNAs perfilados en el tejido prostático maligno había alterado la expresión, en comparación a la normalidad.

La expresión diferencial de miRNAs también facilitó la clasificación de los tejidos malignos en tumores de bajo grado no tratados y de la hormona más agresiva del tejido tumoral, indicando el papel de estos miRNA en la determinación de fenotipo cáncer. Recientemente, los niveles séricos de *miR-141* se ha demostrado para detectar el cáncer de próstata con una sensibilidad y especificidad significativa, poniendo de relieve la función futura de miRNA como biomarcadores de la carcinogénesis (21)

#### **2.4.4. miRNA y la apoptosis**

La apoptosis es un proceso irreversible que permite a las células a someterse a una forma altamente regulada de la muerte, y es esencial para el desarrollo normal y la homeostasis. La evasión de la apoptosis es un sello del cáncer, y desempeña un papel en dictar la evolución de las células neoplásicas. El papel de los miRNAs en la apoptosis de señalización todavía no se ha determinado completamente, sin embargo, varios estudios han indicado un papel regulador en este proceso (21).

#### **2.4.5. siRNAs en cáncer**

En lo que a los siRNA se refiere, son sintetizados con un bajo coste de producción en comparación con las terapias de proteínas o anticuerpos. Además los siRNA tienen unas propiedades farmacocinéticas favorables y pueden ser introducidos en varios tipos de órganos. Sin embargo, su estabilidad en sangre y métodos de transporte son desafíos que deben ser resueltos para desarrollar RNAi efectivos para las terapias de cáncer. Muchos grupos han estado investigando el uso de estructuras alternativas y modificaciones de nucleótidos para mejorar las propiedades clínicas de estos agentes. Por ejemplo, mediante la conjugación del extremo 3' de la hebra sentido del siRNA con colesterol a través pirrolidinas se han mejorado las propiedades farmacológicas de las moléculas de siRNA. La conjugación del colesterol y el siRNA es mucho más resistente a la degradación por nucleasas, incrementando la estabilidad en sangre mediante el aumento en la unión a la albúmina y mostrando un aumento de la absorción en el hígado. Otro estudio ha demostrado que el siRNA modificado con boranofosfato es 10 veces más resistente a las nucleasas que el siRNA no modificado. Además el siRNA con boranofosfato es más potente y parece que actúa a través de la ruta estándar del RNAi.

Como alternativa a las modificaciones estructurales, otros grupos han mejorado la estabilidad de siRNA y su transporte acomplejándose con polietilenimina (PEI) o atelocolágeno. Por ejemplo, en un tumor subcutáneo de un ratón, la administración intraperitoneal de los siRNAs formando un complejo con PEI ayudó a que el siRNA llegara intacto al tumor (21).

## **2.5. Fármacos para el tratamiento de patologías oculares**

Los siRNA están empezando a ser introducidos en programas clínicos para el establecimiento y desarrollo de terapias basadas en esta tecnología (19) y, para ello, se están siguiendo estrategias similares a las llevadas a cabo con los nucleótidos antisentido. Los ensayos preliminares están demostrando el gran potencial terapéutico de estas moléculas.

En este sentido, el tratamiento de enfermedades oculares está sufriendo un gran desarrollo debido a que el ojo es un órgano relativamente aislado, lo que posibilita el desarrollo de aplicaciones locales. Este tipo de aplicaciones presentan numerosas ventajas, ya que permiten reducir los efectos secundarios y la cantidad de producto (20). Una de las primeras patologías oculares donde se están desarrollando terapias basadas en ARNi es en la neovascularización ocular. Reich y colaboradores (21) han analizado el posible tratamiento de afecciones de la retina, confirmado la factibilidad de la terapia.

Se ha demostrado, en un modelo de degeneración macular en ratón, que la inyección ocular de siRNA silencia la sobreexpresión del receptor de VEGF, causa principal de la enfermedad. Kim y colaboradores (22), han llevado a cabo un estudio similar en el que, silenciando tanto el VEGF como su receptor con aplicaciones locales y sistémicas de siRNA específicos, han impedido el desarrollo de queratitis estromales y de neovascularización inducida por la infección con el virus Herpes. Más recientemente, y siguiendo con las líneas de investigación anteriormente comentadas, Acuity Pharmaceuticals ha despuntado como la primera compañía en incluir siRNAs terapéuticos en ensayos clínicos con humanos. Una molécula lanzada se llama Bevasiranib y es un siRNA, capaz de silenciar la expresión de VEGF, efectivo en el tratamiento de la degeneración macular y de la retinopatía diabética. Los estudios

preclínicos han demostrado, en un modelo de primate, que una sola aplicación de dicho compuesto reduce significativamente la neovascularización de una manera dosis dependiente y que es capaz de mantener sus efectos durante cinco días. En cuanto a los ensayos de Fase I en humanos, este producto ha mostrado que su administración es segura y bien tolerada en 15 individuos sanos. Mientras que en los ensayos de Fase II ha observado que el producto es eficaz y tolerado tras la administración en 129 pacientes con degeneración macular. Por otro lado, Sirna Therapeutics, con el compuesto siRNA-027, siRNA frente al receptor de VGF VGFR1, también ha demostrado una clara eficacia del compuesto tras la administración mediante inyección intravítrea y no ha presentado ningún efecto adverso en la Fase I. Por último, se han comenzado recientemente ensayos clínicos de Fase I con una tercera molécula desarrollada por la alemana Atugen AG, denominada RTP801i, de nuevo en degeneración macular asociada a la edad.

Además de en degeneración macular, debe destacarse el desarrollo de esta nueva tecnología para otras patologías oculares como el glaucoma, la retinitis y la retinopatía diabética.

Tabla I. Desarrollo farmacéutico de diferentes patologías oculares empleando la tecnología del RNAi (6).

Fármaco	Indicación	Mecanismo de acción	Fase de desarrollo farmacéutico	País	Empresa
Bevasiranib	Degeneración macular asociada a la edad. Edema diabético macular	RNA de interferencia	Fase II	USA	Acuity pharmaceutical
SIRNA-027	Degeneración macular	RNA de interferencia	Fase I	USA	SIMA therapeutics-MERK
RTP801i	Degeneración macular asociada a la edad	RNA de interferencia	Fase I	Alemania	Atugen-Quark Biothec
I+D	Retinitis citomegalovirus	RNA de interferencia	Preclínica	USA	RXI pharmaceutical
I+D	Patologías oculares	RNA de interferencia	Preclínica	USA	ZaBerCor pharmaceutical
I+D	Degeneración macular asociada a la edad	RNA de interferencia	Preclínica	USA	Alnylam pharmaceuticals
I+D	Glaucoma	RNA de interferencia	Preclínica	USA	Sylentis

En resumen, el descubrimiento del RNAi ha expandido enormemente el conocimiento científico sobre los mecanismos implicados en la regulación génica. Además el desarrollo de tecnologías basadas en RNAi ha proporcionado a la comunidad científica una poderosa herramienta experimental para el estudio de la funcionalidad génica. La adaptación de esta tecnología a la biomedicina, aunque aún en desarrollo, ha abierto expectativas terapéuticas sin precedentes (9)

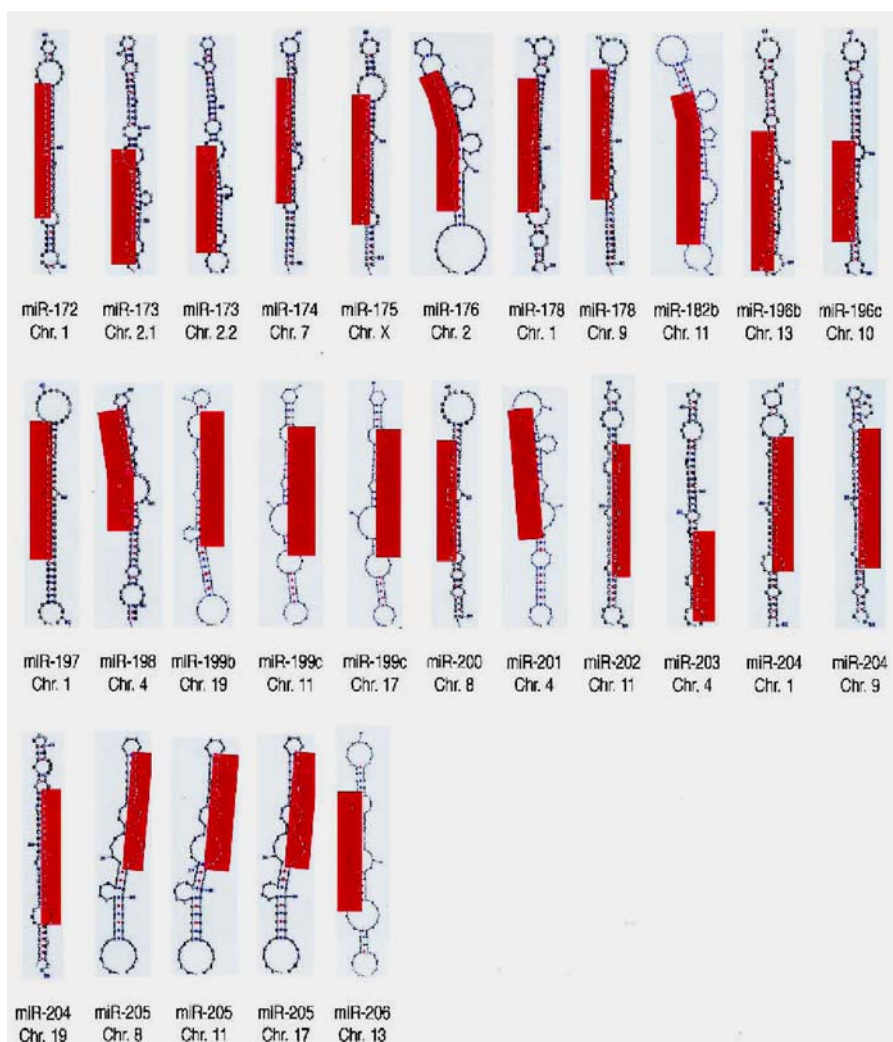
### **Comentarios finales**

Mediante el uso de RNAi se han obtenido resultados importantes en el tratamiento de ciertos padecimientos, y el Q.F.B. puede hacer uso de ella, debido a su amplio campo de trabajo, es este caso en particular, el de la biología molecular, es importante reconocer también las implicaciones del uso de estas técnicas: costos, viabilidad del proceso, durabilidad del efecto terapéutico, etc.

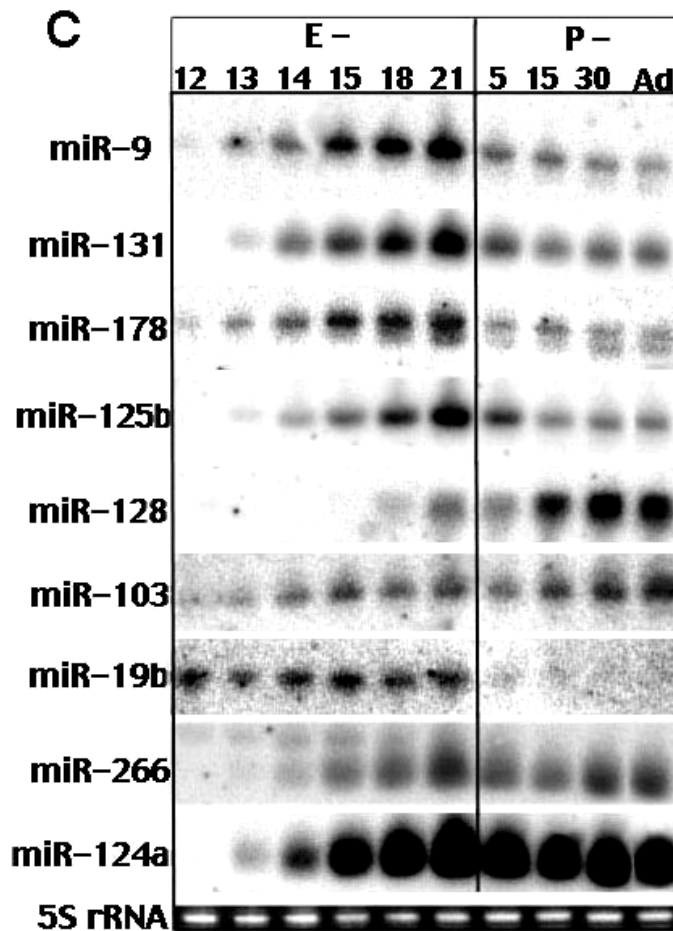
Debido a que se trata de un descubrimiento muy reciente, la terapia con RNAi no se ha desarrollado tan ampliamente como su eficacia lo pide. Sin embargo, los últimos avances han demostrado que cada vez se profundiza más es este proceso milenario de silenciamiento génico y su futuro es prometedor.



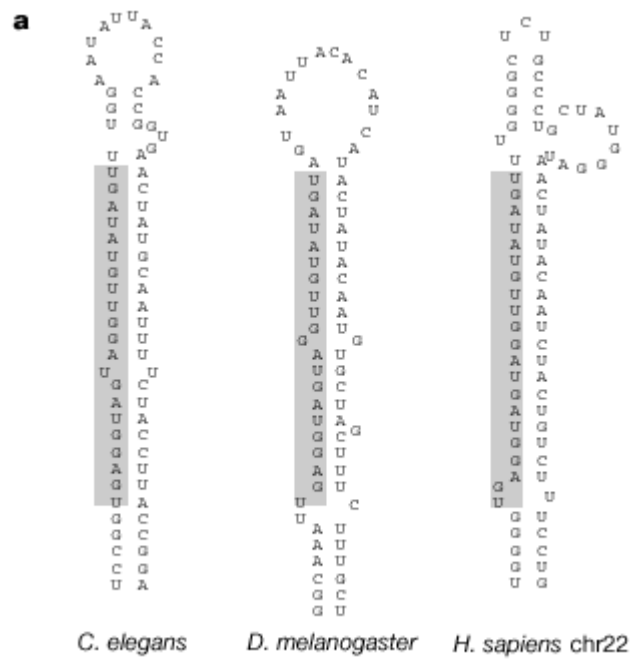
**Apéndice.**



**Apéndice 1. microRNAs expresados exclusivamente en sistema nervioso central del ratón.** La figura muestra las formas de asa (hairpin) imperfectas típicas de microRNAs. En esta figura se muestran microRNAs de expresión exclusiva en el sistema nervioso central. La zona marcada en rojo indica la región de corte de Dicer para producir el microRNA maduro. Nótese como todas estas regiones resultan en microRNAs de 21 nucleótidos de longitud.



**Apéndice 2. Patrones de expresión de algunos microRNAs durante el desarrollo del ratón.** Northern blots mostrando los patrones de expresión durante los días de gestación 12-21 (**E**) en ratones para los microRNAs indicados a la izquierda. Los días indicados con **P** muestran la expresión después del nacimiento. Nótese como miR-128 (indicado por flecha en rojo) inicia su expresión pocos días antes del nacimiento del animal, mientras que miR-19b deja de expresarse justo después del nacimiento (segunda flecha roja). Esta regulación en la expresión tan estricta es típica de microRNAs.



**Apéndice 3. Estructura del microRNA let-7 en diferentes organismos.** La imagen muestra la estructura de let-7 inmaduro (antes de ser cortado por Dicer). En gris sesombrea la secuencia madura de let-7 (la parte que deja libre Dicer al cortar), nótese como aunque el resto de la secuencia del microRNA inmaduro varia en cada especie, la secuencia de let-7 madura de 21 nucleótidos (cortada por Dicer) esta perfectamente conservada en las 3 especies: el nematodo *C. elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el humano.

### Referencias bibliográficas.

1. [www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion02.pdf](http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion02.pdf) (Fecha de consulta 19/08/09)
2. Watson JD; Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356):737-738 (1953)
3. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky y Darnell. *Biología celular y molecular*. 5a. Edición. Editorial Médica Panamericana. Págs. 101-119.
4. Downward J. (2004). Clinical review, Science, medicine and the future. *BMJ* **328**, 1245-1248.
5. Chih-Ping Mao, Yen-Yu Lin, Chien-Fu Hung, T.C. Wu (2007). Immunological Research using RNA Interference Technology. *Immunology* **121**, 295-307.
6. Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick (2005). *Biología molecular del gen*. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana. 607-608, 744-745.
7. González, J. M<sup>a</sup>. (2005) Farmacia hospitalaria terapia génica. *C. L. RONCHERA-OMS*. 919-922-924.
8. Nakamura-López Y., Esparza-Aguilar Ma. D. L., Garrido-Olvera L., Palomar-Olguín V. M., Gallardo-Pérez JC. (2009) Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia. *Bioquímica*. **34**, (1) Págs. 26-36
9. Hernández García. J. L. (2007) ARN de interferencia y su importancia en la biomedicina molecular. *Bioquímica*. **30**, (004), pp. 118-127.
10. López T., Silva D., López S. y Arias C. (2007) RNA de interferencia: el silencio de los genes. *Biotecnología*. **14**, (3) pp. 109.

11. Ortiz-Vázquez G., Sánchez-Piña P., Salcedo M. (julio-agosto 2006) Grandes alcances de los RNA pequeños, RNA de interferencia y microRNA. *Revista de Investigación Clínica*. **58**, (4) pp. 335-349.
12. Salamanca Gómez, F. (2005) El ácido ribonucleico de interferencia: Una nueva herramienta terapéutica. *Biología molecular y medicina*.
13. Alynlam And Collaborators. (2008) Publish New Pre-Clinical Research On Therapeutic Silencing Of Key Gene Implicated In Parkinson's Disease. *Neurodegeneración molecular*.
14. <http://www.accessmylibrary.com/article-1G1-178256840/rnai-huntington-disease-delivery.html>
15. Amy E. Lovett-Racke, PhD; Petra D. Cravens, PhD; Anne R. Gocke, BS; Michael K. Racke, MD; Olaf Stüve, MD, PhD. (2005) Therapeutic Potential of Small Interfering RNA for Central Nervous System Diseases. *ARCH NEUROL*. **62**.
16. Matthew J.A., Barbara Trü lzsch1, Amr Abdelgany2 and David Beeson2 (2003). Therapeutic gene silencing in the nervous system *Human Molecular Genetics*. **12**.
17. Steven D. Buckingham1, Behrooz Esmacili1, Matthew Wood2 and David B. Sattelle1. (2004) RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Human Molecular Genetics*. **13**.
18. Información, inspiración y defensa de la gente con VIH/SIDA.(2003) *PI (Project inform) Perspective*. **36**, Pág. 12-13
19. Chen Y, Cheng G, Mahato RI (2008) De RNAi para el tratamiento de la infección por hepatitis B vírica. *Pharm Res*. **25**:72-86.

20. Deng-guoqiang L., Lisen L., Aihong yin X., Yun G., Wei Y., Wang X. y Dom B. (2009) La inhibición del virus de hepatitis B en ratones por lentivirales horquilla vector mediada corto de RNA. *BMC gastroenterology*. **9**.
21. Takeshita F. Ochiya T. (2006) Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*. **97**: 689-696.
22. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
23. Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 1998; 95: 1017-1026.
24. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
25. Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 711-719.
26. Campochario PA. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Ther* 2006; 13: 559-562.
27. <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>
28. <http://www.alzheimer.org.mx/>
29. Medema H. R. (2004) Optimizing RNA interference for application in mammalian cells. *Biochemical Journal*. **380**. 593-603.

**Referencias de figuras.**

Figura 1. . [www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion02.pdf](http://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion02.pdf) (Fecha de consulta 26/11/09)

Figura 2. Nakamura-López Y., Esparza-Aguilar Ma. D. L., Garrido-Olvera L., Palomar-Olguín V. M., Gallardo-Pérez JC. (2009) Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia. *Bioquimia*. **34**, (1) Págs. 26-36

Figura 3. Watson JD; Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356):737-738 (1953).

Figura 4. Nakamura-López Y., Esparza-Aguilar Ma. D. L., Garrido-Olvera L., Palomar-Olguín V. M., Gallardo-Pérez JC. (2009) Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia. *Bioquimia*. **34**, (1) Págs. 26-36

**Referencias de tabla.**

Tabla 1. Hernández García. J. L. (2007) ARN de interferencia y su importancia en la biomedicina molecular. *Bioquimia*. **30**, (004), pp. 118-127.

**Referencias de apéndice.**

Apéndice 1, 2 y 3. Luis Vaca, Julián Valdés, Fabián Flores y Alicia Sampieri. Departamento de Biología Celular. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Usos y costumbres del RNA de interferencia.