

# Aplicaciones terapéuticas del ARN de interferencia

Yuko Nakamura-López,\* María de Lourdes Esparza-Aguilar,\*\* Lorena Garrido-Olvera,\*\*\*  
Víctor Miguel Palomar-Olguín,\*\*\*\* Juan Carlos Gallardo-Pérez\*\*\*\*\*

## RESUMEN

El silenciamiento génico vía interferencia de ARN (ARNi) mediada por pequeños ARNs de interferencia (siARNs), 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. En esta revisión se expone el enorme potencial de este *knock-down* fisiológico en áreas como la terapia génica o el cáncer, en donde la expresión de ciertos genes favorece la progresión de la enfermedad. Además, se discuten los riesgos derivados de la introducción y liberación de siARNs en los organismos y la importancia del ARNi en un marco clínico en donde es posible inhibir blancos, susceptibles y no susceptibles a fármacos.

**Palabras clave:** ARN de interferencia, terapia, silenciamiento génico, liberación de siARNs.

## ABSTRACT

*The gene silencing via RNA interference (RNAi), which is controlled by small interfering RNAs (siRNAs), is one of the more used experimental techniques of the last years. There is no doubt that the discovery of RNA molecules that can regulate the expression of genes is the most important advance in Biology during last decades. The reason of its success is owing to the fact that it is a conserved biological mechanism which is present in the cells of a great amount of organisms, including the human. This review shows the great potential of RNAi as physiological knock-down in topics such as gene therapy or cancer, where expression of certain genes favors disease progression. Furthermore, discuss the risks derived of siRNAs introduction and delivery in organisms and the importance of RNAi in a clinical frame where it can to inhibit targets susceptible and non susceptible to drugs.*

**Key words:** RNA interference, therapy, gene silencing, siRNAs delivery.

## INTRODUCCIÓN

El ARN de interferencia (ARNi) es una respuesta biológica conservada a ARN de doble hebra (dsARN) la cual media la resistencia a ácidos nucleicos patógenos y regula la expresión de genes.<sup>1</sup> El mecanismo pudo haber evolucionado para interferir con la replicación viral o la actividad de transposones o para responder a otras formas inapropiadas de expresión génica.<sup>2</sup> Ac-

tualmente se está utilizando para reducir la actividad de un gen específico. Debido a que es un mecanismo biológico presente en las células de muchos organismos, incluido el humano, representa una estrategia novedosa y altamente específica para la inhibición fisiológica de la expresión de un gen en particular.

Este fenómeno del ARNi fue observado por primera vez en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* como una respuesta a dsARN; el grupo de investiga-

\* Facultad de Medicina, UNAM; CINVESTAV, IPN.

\*\* Instituto Mexicano del Petróleo.

\*\*\* Instituto de Ecología, UNAM.

\*\*\*\* Facultad de Ciencias, UNAM.

\*\*\*\*\* Instituto Nacional de Cardiología.

### Correspondencia:

Dr. Juan Carlos Gallardo-Pérez. Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Bioquímica. Juan Badiano Núm. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, 4080. México, D.F. Fax: (5552)-55730926, E-mail: jcgallardo@ciencias.unam.mx; jcga\_1999@yahoo.com.mx

Recibido: 20-02-2008

Aceptado: 20-03-2009

ción de Fire encontró que la introducción de dsARN produjo una reducción efectiva y específica del gen *unc-22* que codifica para una proteína del miofilamento del nematodo, lo cual resultó en silenciamiento génico secuencia-específico.<sup>3</sup> En el 2001, el grupo de Morgan demostró que, secuencias dúplex de ARN de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, inducen inhibición del ARN mensajero (mARN) específico de secuencia en células de mamífero transfectadas de manera transitoria sin invocar respuestas antivirales no específicas (como la del interferón) típicamente activadas por moléculas grandes de ARN.<sup>4</sup> Ese mismo año el grupo de Tuschl introdujo pequeños ARNs de interferencia (siARNs) dúplex sintéticos y mostró que el silenciamiento génico postranscripcional, por ARNi, específico de secuencia puede tomar lugar en células de mamífero.<sup>5</sup>

El ARN de interferencia es, por lo tanto, un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional que inicia con la presencia de siARNs. La maquinaria del ARNi opera a distintos niveles: remodelación de la cromatina, inhibición de la traducción y, el más conocido, inhibición y degradación del mARN específico de un gen. Cabe señalar que en el 2006 Andrew Z. Fire y Craig Mello fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por sus descubrimientos en torno al ARNi en células de animales, aunque el mecanismo ya se conocía en plantas.

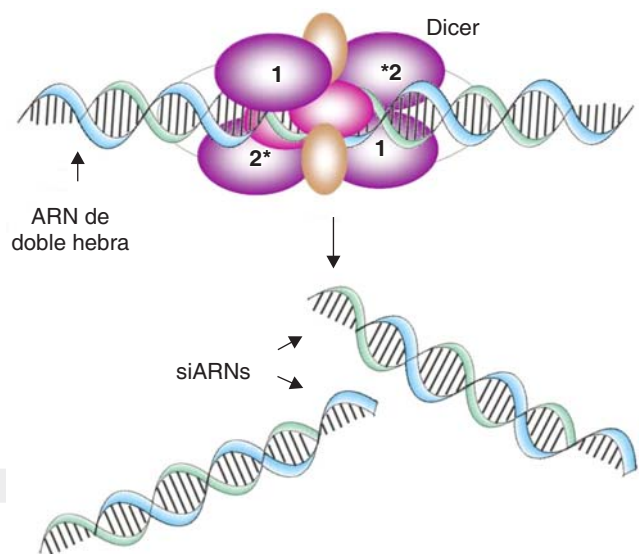
El objetivo de esta revisión es exponer el enorme potencial de este *knock-down* fisiológico en áreas como la terapia génica o el cáncer, en donde la expresión de ciertos genes favorece la progresión de la enfermedad. Además de discutir los riesgos derivados de la introducción y liberación de siARNs en los organismos y la importancia del ARNi en un marco clínico en donde es posible inhibir blancos, susceptibles y no susceptibles a fármacos.

### Mecanismo de acción

Los siARNs son necesarios para iniciar la maquinaria del ARNi; pueden provenir de grandes moléculas de ARN como por ejemplo ARN viral. La generación de siARNs a partir de ARN viral es realizada por una enzima conocida como Dicer.<sup>6</sup> Esta enzima es un miembro de la familia de ribonucleasas RNasa III, la cual está conservada evolutivamente. Dicer contiene un dominio catalítico dual, dominios RNasa III, un dominio de helicasa, un dominio de unión a dsARN y un dominio PAZ (Piwi/Argonauta/Zwille), cuya función es la unión con el ARN.<sup>7,8</sup> Se piensa que esta RNasa III actúa como una enzima dimérica.<sup>9</sup> El ali-

neamiento antiparalelo de los dominios RNasa III de Dicer sobre el sustrato de dsARN produce 4 sitios activos compuestos, pero los dos centrales son defectuosos, uno de cada proteína (*Figura 1*). Así, el corte del dsARN ocurre a intervalos de aproximadamente 22 pb y da lugar a los siARNs.

El mecanismo del ARNi puede también inducirse mediante la presencia de siARNs codificados directamente desde el núcleo o bien siARNs generados a partir de un vector de ADN que contiene un promotor específico de tejido y que sintetiza constitutivamente a estos siARNs. Cualquiera que sea su origen los siARNs presentan algunas características en común: contienen de 21 a 23 nucleótidos de longitud y son dúplex con morfología tipo pasador o tallo-asa (*hair-pin*); contienen un extremo 5' fosforilado y un extremo 3' con dos nucleótidos que sobresalen de la estructura tipo pasador.<sup>10</sup> Estas características los hacen específicos para que puedan ser reconocidos por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*). RISC es una nucleasa efectora multicomponente que reconoce al siARN dúplex y, como presenta actividad helicasa, lo que hace es deshebrar al siARN dúplex, con el ingreso de ATP, a través de la proteína catalítica denominada argonauta.<sup>11</sup> De esta forma, RISC junto con el siARN de una sola hebra, detecta al



**Figura 1.** Generación de siARNs, mediada por Dicer, a partir de ARN 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 GJ, 2004.<sup>1</sup>

mARN 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 mARN blanco mediante una enzima con actividad de RNasa H conocida como *slicer* (Figura 2) la cual tiene un dominio denominado PIWI que interviene en el silenciamiento génico.<sup>12</sup> El corte ocurre sólo en la región homóloga entre el mARN y el siARN.<sup>13</sup> Además, RISC tiene la capacidad de degradar completamente al mARN (Figura 3). Por si fuera poco, RISC posee actividad de polimerasa, de modo que emplea los mismos siARNs como molde para hacer múltiples copias y amplificar la señal de silenciamiento.<sup>1</sup> Este es un fenómeno muy conocido en plantas en donde los siARNs copiados por la actividad de polimerasa de RISC cruzan la pared celular, llegan a otras partes de la planta y regulan procesos tales como la floración.

Los siARNs son altamente específicos en cuanto a longitud: si son menores de 18 nucleótidos pasan desapercibidos por la célula y no inducen ningún tipo de respuesta; si son mayores a 26 nucleótidos, inducen una respuesta del interferón, una respuesta natural de la célula contra ARN viral. El ARN de doble hebra activa a PKR una proteincinasa que se autofosforila y fosforila múltiples blancos, entre los principales se encuentra eIF2 $\alpha$  un componente de la maquinaria de traducción de proteínas. El resultado es la inhibición de eIF2 $\alpha$  y por lo tanto el paro de la síntesis de pro-

teínas. Recientemente se ha reportado que es posible suministrar siARNs sintéticos desnudos (es decir, sin ser clonado en un vector) sin que las células blanco presenten activación de la respuesta contra virus mediada por interferón.<sup>15</sup>

Además, se ha establecido que una complementariedad exacta entre el mARN y el siARN resulta en degradación del mARN, mientras que una inexacta resulta en una inhibición de la traducción.<sup>15</sup>

### Remodelación de la cromatina y siARNs

Además de inhibir la traducción y degradar el mARN, el ARNi también está implicado en la inhibición transcripcional por remodelación de la cromatina. Durante el ARNi, la hebra sentido del siARN es degradada, mientras que 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 ADN por apareamiento de bases complementarias, ya sea con el ADN o con el mARN recientemente generado durante la transcripción. El proceso es más complicado y se piensa que incluye componentes como RISC, metilasas o desacetilasas de histonas y polimerasas.<sup>16</sup>

La intervención de siARNs en la formación de heterocromatina ha sido ampliamente estudiada en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, en la cual, los siARNs heterocromáticos actúan mediante el comple-

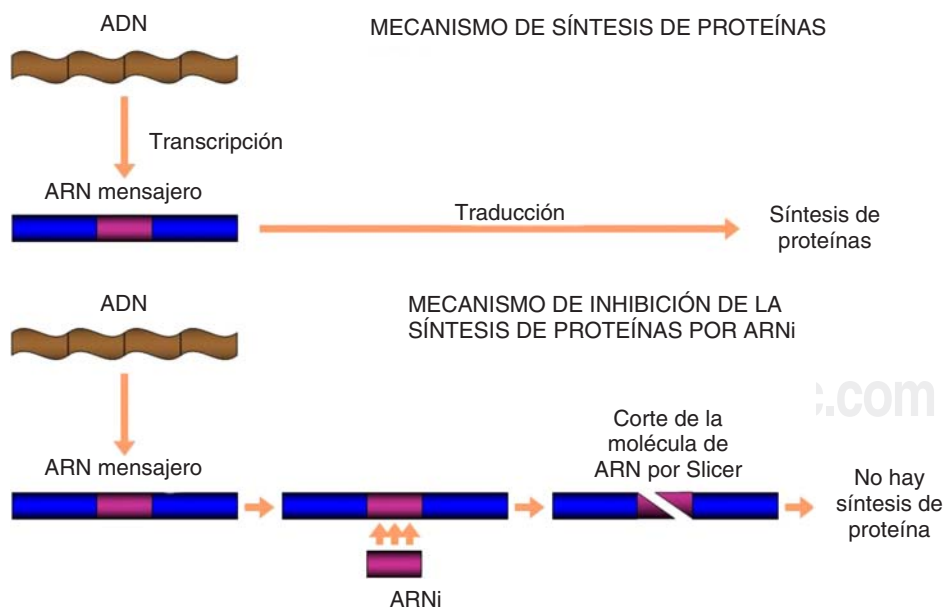


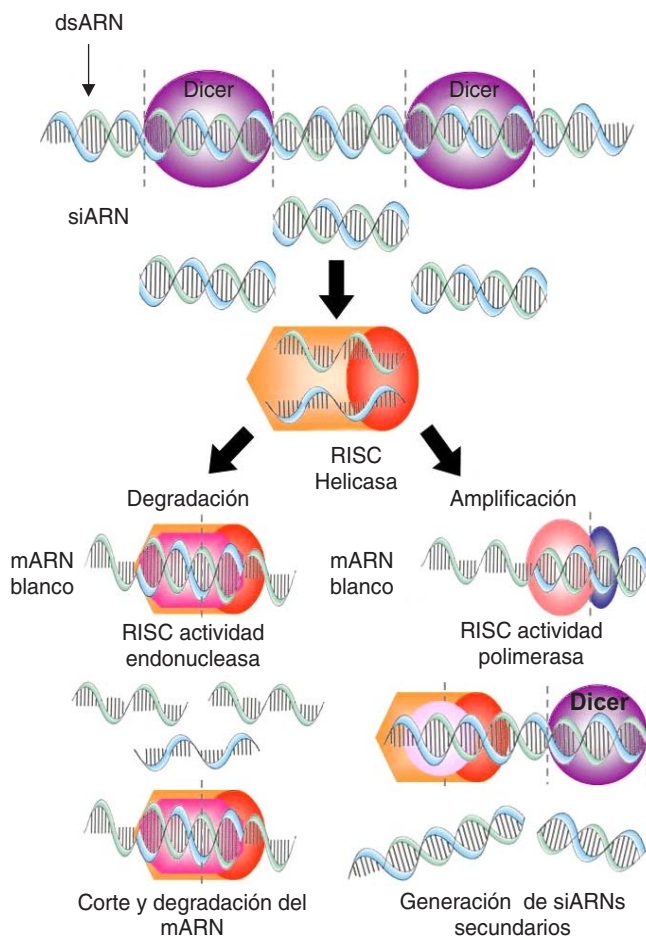
Figura 2. Silenciamiento génico postranscripcional (con ARNi) mediado por siARNs.

jo efector RITS (iniciador del silenciamiento génico transcripcional inducido por ARN) 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 tiene repeticiones centroméricas requeridas para la metilación de la histona H3-K9) y Tas3, una subunidad de función desconocida asociada a Chp1. Los siARNs heterocromáticos derivan de las regiones centroméricas cromosómicas y tienen una función secuencia-específica en el ADN.<sup>17</sup>

### Micro ARNs

Existe otro tipo de pequeños ARNs dentro de la célula, los cuales controlan el desarrollo larvario en *Caenorhabditis elegans*. Éstos son productos de los genes

*lin-4* y *let-7*, los cuales codifican para ARNs de 22 y 21 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.<sup>17</sup> Su expresión etapa-específica y su papel en los eventos de regulación les han acreditado su nombre: pequeños ARNs temporales o stARNs, los cuales también se presentan durante el desarrollo embrionario en humanos. En este caso, los microARNs (miARNs) son codificados en el núcleo como pre-microARNs, de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, por la ARN polimerasa II usando como templado intrones de genes codificantes o intrones y exones de transcritos no codificantes. Estos pre-pre-microARNs son procesados por un complejo proteico que contiene una ribonucleasa denominada Drosha y por una proteína de unión al ARN conocida en humanos como DGCR8, para formar la estructura tipo tallo-asa (*hairpin*). El pre-microARN es transportado por la exportina 5 al citoplasma, en donde son madurados en microARNs por la ribonucleasa III Dicer eliminando la estructura *hairpin* y permitiendo su asociación al complejo RISC.<sup>18</sup>



**Figura 3.** Diagrama de la degradación de mRNA blanco y amplificación de siARNs mediante RISC. Modificado de Déctor MA y Arias CF, 2004.<sup>14</sup>

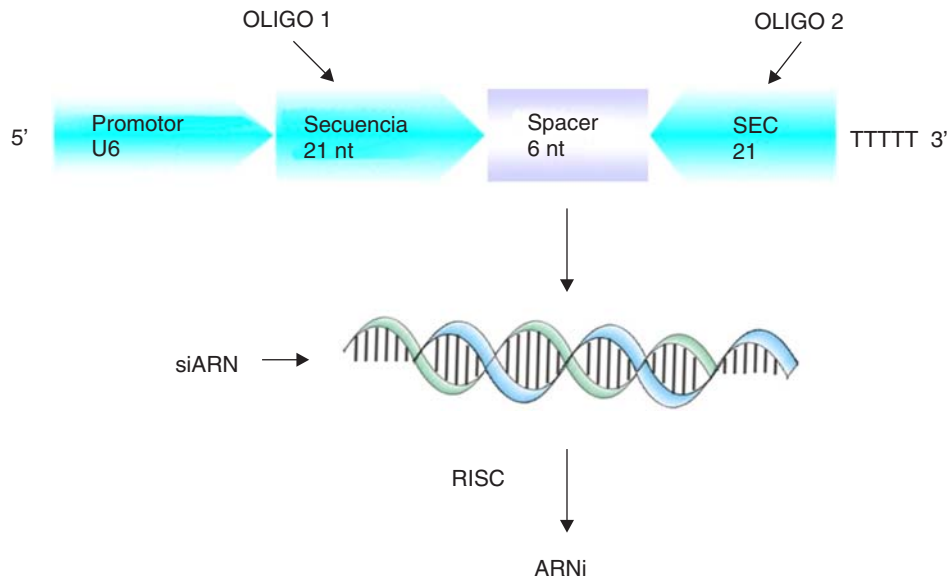
### Liberación de siARNs en células blanco y efectos secundarios

El uso de los siARNs 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 siARN en células de mamíferos. En un principio las células se transfectaban con siARNs desnudos y se observaba un efecto silenciador sobre el gen específico aunque, después de cierto tiempo, la expresión del gen se estabilizaba a sus condiciones basales. Por lo anterior se decidió utilizar siARNs basados en vectores de ADN, es decir, un vector que generara siARNs 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 ARN polimerasa III la cual genera ARNs pequeños y se despegan de la secuencia de ADN luego de encontrar una cola de poliT<sup>1</sup> (Figura 4).

Asimismo, se han empleado vectores virales para infectar células humanas. Los retrovirus mostraron





**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 siARNs) y, finalmente, una cola de al menos 5 timinas. La ARN polimerasa III transcribe esta secuencia y genera los siARNs que son reconocidos por RISC para inducir el corte y degradación del mRNA blanco.

una buena infección de una amplia gama de células de mamífero, 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.<sup>19</sup> Además de los vectores virales se han empleado fusiones de siARNs en liposomas o en complejos con polietilimina (PEI), y las formas de introducirlos que se han utilizado son: vía intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, subcutánea, subretinal y electroporación. En el *cuadro I*, se resumen los mecanismos utilizados para la introducción de siARNs *in vivo*. Todos estos métodos se estudian intensamente, ya que el éxito de una terapia con siARNs depende de varios factores en los cuales se incluyen la protección de los siARNs, la eficacia de la transfección, evitar efectos tóxicos o inespecíficos, la eficacia utilizando pequeñas cantidades de siARNs y la posibilidad de aplicar diversos tratamientos contra distintas enfermedades.

Los retos futuros para que los siARNs puedan ser empleados en la clínica están enfocados en la comprensión de la canalización y procesamiento del siARN por los tejidos blanco, la evaluación de la estabilidad del siARN, 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 siARN, 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

siARNs 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.<sup>33</sup>

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 siARNs pueden tener efectos no específicos a nivel del mRNA y de la proteína.<sup>34</sup> 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.<sup>35</sup> Estos descubrimientos sugieren que los siARNs pueden regular la expresión de blancos involuntarios.<sup>34</sup> Por otro lado, podrían alterar las funciones reguladoras de algunos microARNs celulares, además de que algunas secuencias específicas del siARN pueden obstaculizar la incorporación de otros siARNs.<sup>36</sup> Lo recomendable es tener precaución en la interpretación de la función del gen y los fenotipos resultantes del ARNi.

Es importante señalar que no está aún bien esclarecido cómo las células pueden hacer siARNs (microARNs) sin efectos *off-target* mientras que los siARNs 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 miARN.<sup>37</sup>

Los siARNs pueden ser divididos en 2 grupos de acuerdo a los genes que silencian; el primer grupo involucra el silenciamiento de genes cuya expresión cau-

**Cuadro I.** Aplicaciones de siARNs en estudios *in vivo*.

| Modelo animal                  | Tejido blanco      | Ruta de entrada del siARN        | Formulación del siARN        | Gen blanco                  | Objetivo del estudio/enfermedad  | Referencia |
|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|------------|
| Ratón desnudo                  | Tumor subcutáneo   | Inyección intratumoral           | Citofectina GSV              | EGFP                        | Desregulación de GFP   | 20         |
| Ratón Swiss nu/nu              | Fibrosarcoma       | Inyección intraperitoneal        | Dúplex sintético             | VEGF                        | Inhibición del crecimiento tumoral   | 21         |
| Ratón C57Bl/6                  | Ojos               | Inyección subretinal y bilateral | Dúplex sintético             | EGFP/VEGF                   | Inhibición de la neovascularización ocular   | 22         |
| Ratón BALB/c-TgN y C57BL/6-TgN | Hígado             | Inyección intravenosa            | Dúplex sintético             | Caspasa 8                   | Prevenir apoptosis de hepatocitos para mantener su función                         | 23         |
| Ratón BALB/cAnNCR              | Pulmón             | Inyección intravenosa            | Dúplex sintético             | Nucleoproteína y polimerasa | Inhibición de la replicación de influenza virus                                    | 24         |
| Ratón desnudo                  | Tumor subcutáneo   | Inyección intratumoral           | Complejo con atelocolágeno   | HST-1/FGF-4                 | Inhibición de crecimiento tumoral  | 25         |
| Ratón BALB/c                   | Pulmón             | Administración intranasal        | Dúplex sintético/TransIT-TKO | Proteína P de RSV y PIV     | Prevención y tratamiento de infecciones respiratorias virales                      | 26         |
| Ratón C57Bl/6                  | Nódulos linfáticos | Inyección intradérmica           | Dúplex sintético             | Bak, Bax                    | Modificación de la presentación de antígeno  | 27         |
| Ratón C57Bl/6                  | Tumor subcutáneo   | Pulsos eléctricos                | Dúplex sintético             | GFP                         | Silenciamiento de genes en tumores sólidos   | 28         |
| Ratón                          | Hígado             | Inyección intravenosa            | Dúplex sintético             | HBx                         | Inhibición de la replicación de HBV  | 29         |
| Ratón C57Bl/6                  | Pulmón             | Inyección intravenosa            | Nanopartículas               | MDM2, c-Myc, VEGF           | Inhibición de tumor metastático en pulmón  | 30         |
| Rata                           | Cerebro            | Inyección unilateral intraatrial | Vector virus-adeno asociado  | EGFP                        | Estudio enfermedad de Huntington   | 31         |
| Ratón desnudo                  | Tumor subcutáneo   | Electroporación local            | Dúplex sintético             | VEGF                        | Análisis del sistema de entrada de siARN para la búsqueda de blancos contra cáncer | 32         |

san un daño al propio organismo (genes virales, o genes mutados o resultantes de translocaciones cromosómicas), en este caso los siARNs serán terapéuticos. En contraste, el segundo grupo involucra silenciar genes endógenos para observar su funcionamiento o su papel en el organismo.<sup>38</sup> Cabe señalar que la estrategia de los siARNs se basa en su asociación directa con RISC, sin la necesidad de ser identificados por Dicer.

### **Usos potenciales de los siARNs en el tratamiento de distintas enfermedades**

Aunque el mecanismo del ARNi es un descubrimiento relativamente reciente, se ha empleado para inhibir la expresión de genes específicos que originan enfermedades, y se están desarrollando tecnologías cada vez más modernas para su implementación *in vivo*. En modelos *in vitro* y en animales ya se analiza el efecto de la inhibición de genes causantes de distintas enfermedades.

Recientemente se demostró que es factible utilizar dsARN en animales vivos para prevenir infecciones virales por virus agresivos.<sup>39</sup> Estos hallazgos han permitido especular sobre el posible uso de fragmentos de dsARN como vacunas antivirales, lo que podría representar el inicio de una nueva era de terapias antivirales.

#### **siARNs en enfermedades metabólicas**

Actualmente se utiliza el ARNi para estudiar el papel de diferentes genes en la patogénesis de la diabetes y la obesidad.<sup>40</sup> Uno de los primeros intentos para usar la tecnología del ARNi 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.<sup>41</sup>

Otro grupo diseñó la estrategia de inducir silenciamiento postranscripcional del gen para PEPCK, la enzima que controla la gluconeogénesis utilizando siARNs 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.<sup>42</sup> 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 siARNs dirigidos contra el ARN mensajero de

la apolipoproteína B (Apo B) en hígado, y se obtuvo una disminución en los niveles de dicha proteína en plasma.<sup>43</sup> Apo B es una proteína involucrada en el metabolismo de 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 de enfermedades coronarias.<sup>44</sup>

Además, se observó que la inyección intravenosa de siARNs contra ApoB 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.<sup>45</sup> La saga de ejemplos exitosos de siARNs terapéuticos fue el de la administración intravenosa de siARNs modificados en ratones con tumores xenoinjertados. En este modelo, un grupo muy amplio de investigadores inhibió el mensajero de la apolipoproteína B (Apo B) en el hígado y en el yeyuno;<sup>46</sup> observando una disminución del nivel en plasma de Apo B y reducción de los niveles de colesterol total, permitiendo observar la estabilidad de los siARNs y su eficiencia en un sistema *in vivo*. Estos resultados sugieren que el ARNi tiene el potencial para convertirse en una nueva terapia para el tratamiento de enfermedades metabólicas.

#### **siARNs, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y hepatitis C (VHC)**

Se ha demostrado que los siARNs pueden potencialmente interferir con la replicación del VIH ya que, *in vitro*, la transfección de siARNs que inhiben *rev*, *gag*, *vif*, *nef*, *tat*, *env* o secuencias LTR virales inhibieron efectivamente la replicación del virus en linfocitos primarios de sangre periférica y en macrófagos.<sup>47,48</sup> Debido a que el VIH muta demasiado, las secuencias de los siARNs deberán estar en un cóctel que cubra una amplia gama de secuencias, lo más conservadas posibles dentro del genoma viral. Lo anterior fue evaluado por el grupo de Berkhout<sup>49</sup> cuando expresaron tres diferentes siARNs, dirigidos contra secuencias virales, en un solo vector y observaron una mayor disminución en la producción de virus que en el control (un vector con sólo un siARN).

Con respecto a los estudios en virus de la hepatitis C, se han diseñado siARNs que tienen como blanco secuencias conservadas en la región 5' no traducida de su ARN mensajero, la cual es crucial para el inicio de la traducción de la proteína, y se observó una fuerte inhibición en la producción del virus en cultivos celulares.<sup>50</sup>

## siARNs y cáncer

Diversos estudios importantes destacan la utilización de siARNs en el silenciamiento de oncogenes y su efectividad en reducir la tumorigenicidad *in vivo*. El primer oncogen en ser inhibido por ARNi fue K-Ras en el que se observó una inhibición del crecimiento tumoral en ratones desnudos atímicos.<sup>51</sup> Después de éste, siguió una gran lista de oncogenes disminuidos por ARNi en diversos modelos,<sup>52</sup> los cuales ya empiezan a ser probados *in vivo* con el objeto de encontrar mejores métodos para infectar células blanco, evitar efectos secundarios y los efectos *off-target*. Recientemente un estudio *in vitro* con células SGC-7901 de carcinoma gástrico humano empleando siARN contra survivina (una proteína inhibidora de la apoptosis sobreexpresada en cáncer) demostró una inhibición en el crecimiento del tumor y la inducción de apoptosis en esas células.<sup>53</sup>

Una organización del Instituto de Investigación Genómica Traduccional en Maryland realiza un análisis de células en cultivo y células primarias para hallar blancos relacionados a la biología y progresión de células cancerosas.<sup>54</sup> Estos avances entran en el terreno de la era postgenómica, ya que se analizan enormes cantidades de genes que puedan dar indicio a la mejor comprensión del cáncer y de sus blancos susceptibles a fármacos. Esta organización utiliza una biblioteca de 10,000 siARNs contra 5,000 blancos susceptibles a fármacos y cerca de 25,000 vectores que producen siARNs. Además, con estos análisis es posible evaluar el efecto de la inhibición de un gen blanco sobre otros genes relacionados y así poder observar posibles efectos colaterales y seleccionar aquellos que sean altamente específicos. Otros grupos especializados en el análisis o *screening* de alto rendimiento (Galápagos *Genomics*) analizan también el efecto de siARNs contra 4,900 blancos susceptibles de fármacos en un rango de enfermedades que van desde artritis reumatoide hasta asma o enfermedad de Alzheimer. Este grupo utiliza virus para infectar sus células en placas de microtitulación, con lo que consiguen análisis de alto rendimiento para la validación de blancos terapéuticos mediante siARNs.

Finalmente, se ha observado la presencia de miARNs durante el desarrollo del cáncer, ya que éstos pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumor al disminuir la expresión de proteínas involucradas en proliferación celular o apoptosis.<sup>55</sup> Además, se ha encontrado que estos miARNs funcionan en muchos aspectos de la carcinogénesis (adhesión, angiogénesis e

invasión de tejidos) lo que indica la importancia del mecanismo del ARNi en el desarrollo de los tumores.

## siARNs y desórdenes genéticos

Durante mucho tiempo se ha buscado un tratamiento para desórdenes genéticos dominantes, el uso de la tecnología de ARNi puede ser un buen recurso. Se ha reportado evidencia exitosa en modelos animales con mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa (SOD1), causante de la esclerosis amiotrófica lateral (ALS), en los cuales siARNs introducidos mediante vectores virales inducen una reducción de la expresión de SOD1 y aumentan la supervivencia de neuronas motoras. Lo anterior representa una aproximación de terapia para desórdenes genéticos caracterizados por propiedades tóxicas.<sup>56</sup> Uno de los retos para este tratamiento es el inhibir específicamente al alelo mutado y mantener la función del alelo normal, para estudiar esto, el grupo de Xu realizó experimentos con ratones transgénicos, con los cuales comprobaron que los ARNi silencian al gen de manera alelo-específica, lo cual representa un beneficio para la terapia *in vivo*.<sup>57</sup>

## siARNs en 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 exon mutante de *htt* es suficiente para causar la enfermedad vía un mecanismo de obtención de función,<sup>58</sup> por lo que se ha propuesto el uso de siARNs para disminuir la expresión del gen *htt* mutado como una estrategia terapéutica.<sup>59</sup>

La introducción de siARNs en ratones transgénicos HD (*Huntington's Disease*) después de su 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*.<sup>58</sup>

Esto abre la posibilidad de tratamientos en ésta y otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, enfermedades que están incrementando su número de casos dentro de la población mundial.



## Potencialidades y retos futuros de los siARNs

A pesar de que los siARNs tienen un menor poder de inhibición génica comparados con los miARNs, ingresar en una vía de silenciamiento común (vía ARNi) les confiere propiedades de fármacos, además de que, por ser sintéticos, pueden ser modificados químicamente y ser manejados a nivel industrial, obteniéndose así un gran potencial terapéutico de estos siARNs.

Hasta este momento, algunos de los probables fármacos diseñados con siARNs se encuentran en fases clínicas de evaluación muy tempranas como es el caso del silenciamiento de Apo B, proteína involucrada en la hipercolesterolemia. Este tratamiento ha tenido mucho éxito en pruebas con roedores y recientemente se han publicado las pruebas en primates no-humanos, las cuales dan cabida a la posible introducción del siARN en fases clínicas en humanos, ya que presentan la característica de silenciamiento dosis-dependiente, misma que es importante para la acción de un fármaco en una terapia.<sup>60</sup> Otros probables fármacos diseñados con siARNs están en una fase más avanzada de desarrollo, como el caso de ALN-RSV01 de *Alnylam Pharmaceuticals*, un siARN diseñado para el tratamiento del virus respiratorio sincicial (RSV por sus siglas en inglés), el cual ha demostrado tolerancia en adultos sanos en la fase clínica I, siendo seguro y tolerado en adultos con infección experimental en la fase clínica II.<sup>61</sup>

A pesar de lo anterior, muchos probables fármacos diseñados con siARNs encuentran problemas en cuanto a las pruebas *in vivo* y las clínicas, por ejemplo, a pesar de que el fármaco ALN-RSV01 ha obtenido mucho éxito en las pruebas en adultos en la fase II, la neumonitis causada por el RSV tiene una mayor incidencia y potencial infeccioso en niños menores de 2 años y adultos mayores, por lo que las pruebas no necesariamente reflejan que el fármaco sea efectivo o seguro.

Otra de las limitantes del tratamiento con siARNs es la vía de administración. Debido a que estos fármacos están diseñados para ser efectivos a dosis nanomolares o picomolares, deben de ser introducidos en un sitio cercano al tejido o células blanco.<sup>60</sup> En el caso de virus involucrados a enfermedades respiratorias se ha observado que la inhalación es el método más efectivo de introducción del siARN, pero es necesaria una mayor dosis de éste. Sin embargo, las enfermedades virales en la mayoría de los casos están provocadas por 2 o más virus, y se ha visto que el exceso de un siARN modera el efecto inhibitorio del

otro debido a la maquinaria de ARNi compartida. Por lo anterior se ha propuesto que una administración baja y constante del fármaco puede resultar muy potente contra las enfermedades virales.<sup>62</sup>

Debido a que existen muchas vías metabólicas, como la glicólisis, cuyas enzimas no son susceptibles a ser inhibidas específicamente por fármacos diseñados, el ARN de interferencia puede ser de utilidad al disminuir la expresión de enzimas que controlen el flujo metabólico en células tumorales, por ejemplo.

Finalmente, los retos futuros incluyen lograr una mejor estabilidad de los siARNs, eficientizar los métodos de liberación al organismo y disminuir los efectos *off-target* para poder comercializarlos como fármacos terapéuticos.

## CONCLUSIONES

El ARNi ha emergido rápidamente como una herramienta para identificar funciones de genes y terapia génica. La tecnología del ARNi facilita el análisis de vías de señalización involucradas en el desarrollo de la obesidad, resistencia a insulina y diabetes, además, de la identificación y validación de nuevos blancos para la intervención terapéutica del SIDA o el cáncer.

Si bien el empleo de siARNs resulta alentador en la inhibición de infecciones virales o la disminución del crecimiento tumoral, aún falta resolver el problema de la vía de administración en humanos, efectos secundarios, dosis, contraindicaciones, etc.

Por otro lado, el uso de ARNi como una herramienta en el silenciamiento impulsará notablemente el avance en la determinación de la función de los miles de genes sin función conocida, presentes en los genomas de animales de interés en el laboratorio y del mismo hombre. Existen estudios enfocados en silenciar genes con funciones desconocidas en ratones y otros organismos. Un trabajo sistemático de este tipo permitiría conocer la función de la mayoría de los genes que forman un genoma complejo (como el del ratón) en tan sólo unos años.<sup>13</sup> Conociendo la función de los genes en el ratón, se podría inferir la función de homólogos de estos genes en humanos. Además, las nuevas tecnologías pronto permitirán fabricar ARNi *chips*, arreglos de siARNs sobre los cuales se podrá evaluar el efecto de la supresión de cada gen en el genoma humano.<sup>11</sup> Trabajos recientes han demostrado que es factible silenciar simultáneamente todos los genes de un cromosoma completo del nematodo *C. elegans*, lo cual ha dado un nuevo concepto: ARNi genómico.<sup>63</sup>

Finalmente, el ARNi, mediante el empleo de siARNs, nos brinda una posibilidad insuperable de silenciar genes de forma simultánea y rápida en diferentes modelos y enfermedades. Es posible que en los próximos años este tipo de terapias estén disponibles para el ser humano.

## REFERENCIAS

- Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002; 6894: 244-251.
- Moss EG. RNA interference: it's a small RNA world. *Curr Biol*. 2001; 19: R772-5.
- 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; 6669: 806-11.
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 17: 9742-7.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001; 6836: 494-8.
- Bosher JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: E31-6.
- Tong AW, Zhang YA, Nemunaitis J. Small interfering RNA for experimental cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther*. 2005; 2: 114-24.
- Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 2003; 426: 468-74.
- Carmell MA, Hannon GJ. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 3: 214-218.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000; 1: 25-33.
- Zamore PD. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol*. 2001; 9: 746-50.
- Parker JS, Roe M, Barford D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J*. 2004; 23: 4727-37.
- Juliano RL, Dixit VR, Kang H, Kim TY, Miyamoto Y, Xu D. Epigenetic manipulation of gene expression: a toolkit for cell biologist. *J Cell Biol*. 2005; 6: 847-57.
- Déctor MA, Arias CF. Interferencia por ARN: un sistema de defensa primitivo. *Ciencia*. 2004; 55: 25-36.
- Heidel JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol*. 2004; 12: 1579-82.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 4: 657-85.
- Verdel A, Songtao J, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SIS, et al. RNAi-Mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*. 2004; 303: 672-6.
- Moss EG. MicroRNAs: hidden in the genome. *Curr Biol*. 2002; 4: R138-40.
- Berkhout B, Jeang KT. RISCy business: MicroRNAs, pathogenesis, and viruses. *J Biol Chem*. 2007; 282: 26641-5.
- Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296: 1000-4.
- Filleur S, Courtin A, Ait-Si-Ali S, Guglielmi J, Merle C, Harel-Bellan A, et al. SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer Res*. 2003; 63: 3919-22.
- Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM, et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*. 2003; 9: 210-6.
- Zender L, Hutker S, Liedtke C, Tillmann HL, Zender S, Mundt B, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 7797-802.
- Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 8682-6.
- Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, et al. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: e109.
- Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*. 2005; 11: 50-5.
- Kim TW, Lee JH, He L, Boyd DA, Hardwick JM, Hung CF, et al. Modification of professional antigen-presenting cells with small interfering RNA *in vivo* to enhance cancer vaccine potency. *Cancer Res*. 2005; 65: 309-16.
- Golzio M, Mazzolini L, Moller P, Rols MP, Teissié J. Inhibition of gene expression in mice muscle by *in vivo* electrically mediated siRNA delivery. *Gene Ther*. 2005; 12: 246-51.
- Weinberg MS, Ely A, Barichiev S, Crowther C, Mufamadi S, Carmona S, et al. Specific inhibition of HBV replication *in vitro* and *in vivo* with expressed long hairpin RNA. *Mol Ther*. 2008; 15: 534-41.
- Li SD, Chono S, Huang L. Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. *Mol Ther*. 2008; 16: 942-6.
- Franich NR, Fitzsimons HL, Fong DM, Klugmann M, Durning MJ, Young D. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther*. 2008; 16: 947-56.
- Takei Y, Nemoto T, Mu P, Fujishima T, Ishimoto T, Hayakawa Y, et al. *In vivo* silencing of a molecular target by short interfering RNA electroporation: tumor vascularization correlates to delivery efficiency. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7: 211-21.
- Layzer JM, McCafrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*. 2004; 10: 766-71.
- Jackson AL, Linsley PS. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet*. 2004; 20: 521-4.
- Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umavam L, Lee JC, et al. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 1892-7.
- Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, Li H, Shively L, Aagaard L, et al. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acid Res*. 2007; 35: 5154-64.
- Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 2004; 18: 504-511.

38. Devroe E, Silver PA. Therapeutic potencial of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 3: 319-27.
39. Valdes VJ, Sampieri A, Sepulveda J, Vaca L. Using double-stranded RNA to prevent *in vitro* and *in vivo* viral infections by recombinant baculovirus. *J Biol Chem.* 2003; 21: 19317-24.
40. Rondinone CM. Minireview: ribonucleic acid interference for the identification of new targets for the treatment of metabolic diseases. *Endocrinology.* 2006; 6: 2650-6.
41. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 6865: 799-806.
42. Gomez-Valades AG, Vidal-Alabro A, Molas M, Boada J, Bermudez J, Bartrons R, et al. Overcoming Diabetes-Induced Hyperglycemia through Inhibition of Hepatic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) with RNAi. *Mol Ther.* 2006; 13: 401-10.
43. Burnett JR, Barrett PH. Apolipoprotein B metabolism: tracer kinetics, models, and metabolic studies. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2002; 2: 89-37.
44. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986; 4746: 34-47.
45. Farese RV Jr, Ruland SL, Flynn LM, Stokowski RP, Young SG. Knockout of the mouse apolipoprotein B gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 5: 1774-8.
46. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 2004; 7014: 173-8.
47. Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature.* 2002; 6896: 435-438.
48. Surabhi RM, Gaynor RB. RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol.* 2002; 24: 12963-73.
49. Ter-Brake O, Konstantinova P, Ceylan M, Berkhout B. Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther.* 2006; 14: 883-92.
50. Chevalier C, Saulnier A, Benureau Y, Fléchet D, Delgrange D, Colbère-Garapin F, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection in cell culture by small interfering RNAs. *Mol Ther.* 2007; 8: 1452-62.
51. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell.* 2002; 3: 243-47.
52. Rye PD, Stigbrand T. Interfering with cancer: a brief outline of advances in RNA interference in oncology. *Tumor Biol.* 2004; 5-6: 329-36.
53. Miao GY, Lu QM, Zhang XL. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2007; 8: 1170-4.
54. Clayton J. RNA interference: the silent treatment. *Nature.* 2004; 7008: 599-605.
55. Dalmaty T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene.* 2006; 25: 6170-5.
56. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med.* 2005; 4: 429-33.
57. Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z. Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit *in vivo*. *Neurobiol Dis.* 2006; 3: 578-86.
58. Wang YL, Liu W, Wada R, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci Res.* 2005; 53: 241-9.
59. Haque NS, Borghesani P, Isacson O. Therapeutic strategies for Huntington's disease based on a molecular understanding of the disorder. *Mol Med Today.* 1997; 3: 175-83.
60. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi mediated silencing in non human primates. *Nature.* 2006; 441: 111-4.
61. de Fougereilles A, Novobrantseva T. siRNA and the lung: research tool or therapeutic drug? *Curr Opin Pharm.* 2008; 8: 280-5.
62. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Med.* 2005; 11: 50-5.
63. Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high throughput RNAi. *Curr Biol.* 2001; 11: 171-6.