
ARTÍCULO DE REVISIÓN

RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes

Blanca Ortiz-Quintero*

* Investigador en Ciencias Médicas. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

**RNA interference:
from origins to a novel tool for gene silencing**

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is a conserved biological mechanism triggered by double-stranded RNA from exogenous (small interfering RNA, siRNA) or endogenous origin (microRNAs, miRNA) that inhibits gene expression at transcriptional level. First discovered as an ancient anti-viral response, RNAi is now recognized as a natural regulatory mechanism for silencing gene expression in eukaryotes and as a powerful tool for investigating gene function. Over the last seven years, RNAi has become a valuable and standardized tool to silence gene expression in almost every scientific research field. This review describes the RNAi as a biological response and as a research tool for silencing gene expression, focusing on primary information required when the RNAi is applying for first time at a laboratory. It provides a basic guide to promote RNAi advantages and a list of available web tools for RNAi application in research field at a laboratory. Information about RNAi-based therapeutics development is included.

RESUMEN

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo biológico conservado que inhibe específicamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional, en respuesta a la presencia de RNA de doble hebra que proviene de la propia célula (microRNA o miRNA) o del exterior de la misma (RNA pequeños de interferencia o siRNA). Identificado por primera vez como un mecanismo anti-viral conservado evolutivamente, el RNAi surge como un proceso natural de regulación de la expresión de genes en eucariotes y como una potente herramienta para el "silenciamiento" artificial de genes en investigación. Así, en los últimos 10 años, el RNAi se ha convertido en una invaluable y estandarizada herramienta de experimentación para la caracterización funcional de genes en todo laboratorio y en prácticamente toda área de la investigación científica. La siguiente revisión describe el RNAi como proceso biológico y su aplicación como herramienta en investigación experimental, basándose particularmente en las dudas que surgen al montar las técnicas por primera vez en un laboratorio. La información contenida es simple y pretende difundir las ventajas del RNAi e incluye las fuentes de información técnica especializada para facilitar la aplicación del RNAi en cualquier laboratorio. El escrito incluye información acerca del desarrollo de estrategias para la aplicación del RNAi en organismos vivos y su aplicación en la terapéutica, así como las pruebas en fase clínica que se llevan a cabo actualmente por compañías farmacéuticas.

Key words. RNA interference (RNAi). Knocking down. Research tool. Small interference RNA (siRNA). microRNA (miRNA). RNAi-based therapeutic.

Palabras clave. RNA de interferencia (RNAi). Herramienta en investigación. Silenciamiento de genes ("knocking down"). RNA "pequeños" de interferencia (siRNA). microRNA (miRNA). Mirtrones ("mirtrons"). RNAi en terapéutica.

INTRODUCCIÓN

El RNAi fue caracterizado por primera vez en 1998, cuando Fire y Mello demostraron que la introducción de RNA de doble hebra (dsRNA por sus siglas en inglés) en el nemátodo *Caenorhabditis ele-*

gans indujo la degradación del RNA mensajero (mRNA) que presentaba una secuencia complementaria a una u otra hebra del dsRNA,¹ resultando en el silenciamiento del gen correspondiente. Esta degradación del mRNA, específicamente dependiente de la secuencia del mismo, fue llamada RNA de interfe-

rencia (RNAi). Este fenómeno de silenciamiento de genes en respuesta a dsRNA había sido observado previamente en plantas y hongos, siendo el RNA viral la fuente del dsRNA.²⁻⁵ Estudios posteriores demostraron que todos los organismos eucariotes estudiados, incluyendo plantas hongos y animales invertebrados, presentaban de manera conservada el RNAi en respuesta a dsRNA.

Debido a que la fuente natural de RNA de doble hebra son las infecciones virales, se determinó que el RNAi es un mecanismo anti-viral evolutivamente conservado.

RNAi (plantas hongos y animales invertebrados)

Los estudios para determinar los mecanismos involucrados en el RNAi se realizaron principalmente

en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y en la mosca de la fruta *Drosophila*, introduciendo dsRNA de ~ 500 nucleótidos (dsRNA "largos"). Como primer paso, el dsRNA "largo" penetra la célula y es reconocido por la RNasa de tipo-III llamada Dicer (Figuras 1 y 5). A continuación, Dicer escinde el dsRNA en RNA pequeños de doble hebra (siRNA, por sus siglas en inglés) de 22-25 nucleótidos de largo con 2-3 nucleótidos no pareados en el extremo 3' de cada hebra, un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'.⁶⁻⁹ Estos siRNAs son reclutados por el complejo proteico de silenciamiento-inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés).⁹ RISC separa las hebras del siRNA y utiliza la hebra anti-sentido como guía para reclutar la molécula del mRNA que presenta la secuencia complementaria (mRNA blanco).^{10,11} A continuación, RISC escinde el mRNA, el cual es rápidamente degradado.

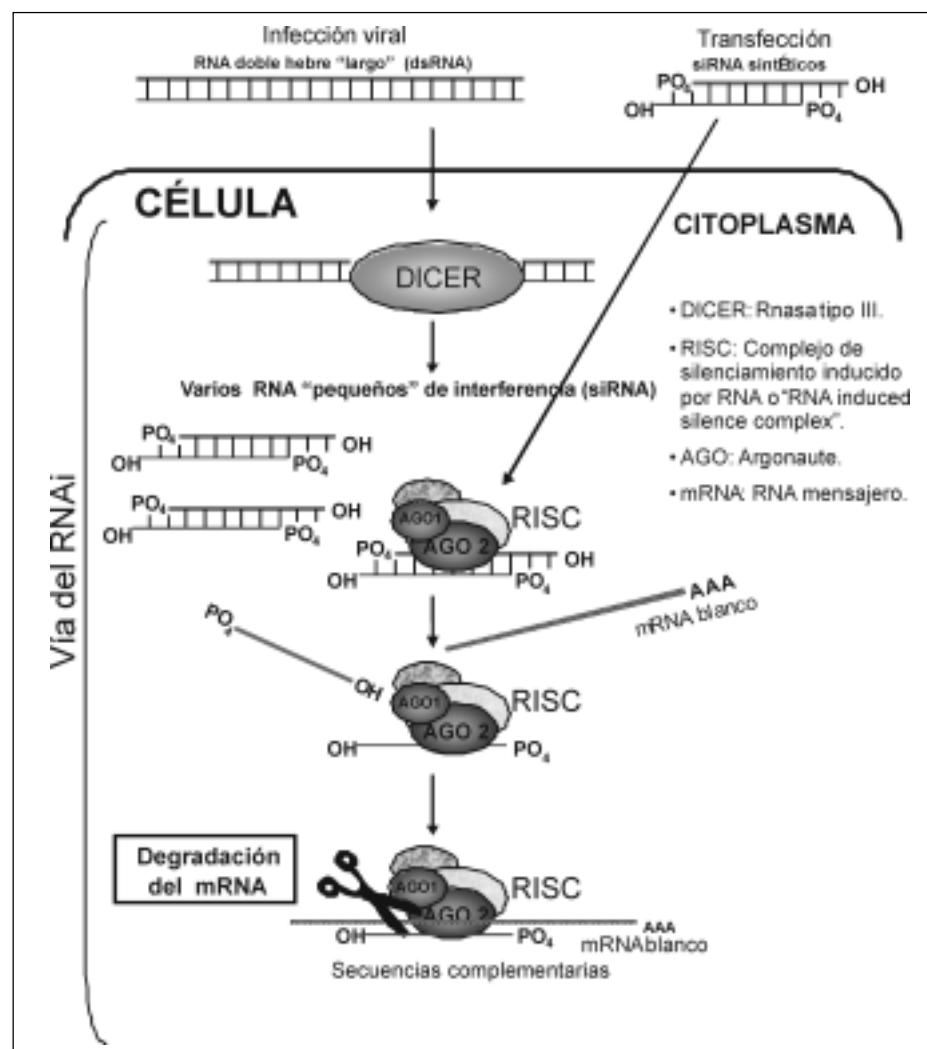


Figura 1. Mecanismo de RNAi mediado por siRNAs exógenos. RNA de doble hebra "largos" (dsRNA "largos") penetran la célula y son procesados por la RNasa tipo III llamada Dicer. Dicer escinde el dsRNA "largo" en RNA pequeños de doble hebra (siRNA) de 21-23 nucleótidos (nt) con 2 nt no pareados en cada extremo 3' y un grupo fosfato en cada extremo 5'. Los siRNAs son entonces reclutados por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés), el cual separa las hebras del siRNA. RISC utiliza la hebra anti-sentido como guía para incorporar al mRNA con la secuencia complementaria a dicha hebra y a continuación el mRNA es escindido, inhibiendo así la expresión del gen correspondiente. Por otro lado, es posible introducir artificialmente a la célula siRNA sintéticos y desencadenar el mecanismo del RNAi cuando dichos siRNAs sintéticos son incorporados a RISC directamente.

La hebra guía del siRNA y el mRNA blanco debe presentar una perfecta complementariedad cerca del sitio de rompimiento/ruptura, el cual se sitúa a 10-11 nucleótidos del extremo 5' del siRNA.⁸

RNAi en mamíferos

A diferencia de los invertebrados, la introducción de dsRNA “largos” en células *somáticas* de mamíferos indujo la activación de la respuesta anti-viral mediada por la producción de interferón (IFN), la cual produce la inhibición general de la traducción y la apoptosis celular. La producción de IFN activa la expresión de varios genes, incluyendo la expresión de la proteína-cinasa dependiente de RNA (PKR). PKR reconoce dsRNAs y a continuación fosforila e inactiva al factor de iniciación 2 (eIF2- α), inhibiendo así la traducción del mRNA de forma generalizada.¹²⁻¹⁴ Aparentemente, el mecanismo anti-viral del RNAi había sido sustituido por una respuesta más evolucionada en los vertebrados. Sin embargo, la maquinaria necesaria para desencadenar el RNAi se encuentra todavía presente en mamíferos, como se demostró en los trabajos publicados por Elbashir, *et al.* y Caplen, *et al.* en el 2001.^{15,16} En dichos trabajos, los dsRNA “largos” fueron sustituidos por RNAs de doble hebra de 21-25 nucleótidos sintéticos, imitando la estructura de los siRNAs producidos por el RNAi en los invertebrados (Figura 2). La introducción de estos siRNA en células *somáticas* de mamíferos indujo el fenómeno de silenciamiento específico de genes, sin inducir la respuesta mediada por IFN. En este caso, los siRNAs entran a la maquinaria del RNAi al incorporarse directamente al complejo RISC sin requerir la acción de Dicer (Figura 4). Este hallazgo es la base del desarrollo del RNAi como herramienta de experimentación para el “silenciamiento” específico de genes en mamíferos, utilizando siRNA (< 30 nucleótidos) sintetizados químicamente e introducidos artificialmente a las células. Estudios posteriores demostraron la existencia de los componentes del RNAi en mamíferos equivalentes a los encontrados en invertebrados plantas y hongos, incluyendo Dicer.^{17,18}

MicroRNAs, mirtrones y siRNAs endógeno (hpRNAs): RNA de doble hebra de origen endógeno

- **MicroRNAs.** A pesar de que la maquinaria necesaria para desencadenar el RNAi está presente en mamíferos, no existen evidencias de la generación *natural* de siRNA a partir de dsRNA largos de

origen exógeno en *células somáticas de mamíferos*. Sin embargo, en poco tiempo se demostró la existencia de RNA pequeños de doble hebra (~ 22 nucleótidos) de origen endógeno (microRNAs o miRNAs), estructuralmente similares a los siRNAs. A diferencia de los siRNAs de origen exógeno, estos miRNAs provienen del procesamiento de precursores dsRNA producidos en el núcleo de la propia célula,¹⁹⁻²¹ proceso catalizado por el complejo *Drosha* formado por la enzima de la familia de las RNasa tipo-III *Drosha* y la proteína de unión a dsRNA DGCR8.³⁵⁻³⁷ Los productos de este procesamiento son exportados al citoplasma por el complejo transportador nuclear exportin-5-RanGTP, en donde son procesados por Dicer (vía del RNAi) para producir los miRNA maduros (Figura 2). Las evidencias demostraron rápidamente que los miRNAs constituyen una nueva vía de regulación genética en todas las especies estudiadas, en donde el miRNA reconoce secuencias parcialmente complementarias en el mRNA correspondiente, lo cual resulta en la inhibición de la traducción de dicho mRNA.^{22,23} En noviembre del 2007 se reportaron 5,922 secuencias de miRNAs expresados en 58 especies distintas,³³ incluyendo plantas y animales vertebrados e invertebrados, indicando un proceso de regulación evolutivamente conservado.³¹⁻³⁴ Los miRNAs han sido relacionados con la regulación de la expresión de genes involucrados con el desarrollo, proliferación, hematopoyesis y muerte celular.²⁴⁻²⁸ La figura 2 muestra la biosíntesis del miRNA: una RNA polimerasa II transcribe el gen para el miRNA dando lugar al miRNA primario o pri-miRNA (~ 60-100 nucleótidos) con estructura de “hairpin”, en el núcleo celular.¹⁹⁻²¹ “Hairpin” (por su descripción en inglés), se refiere a la estructura que forma una hebra con secuencias de nucleótidos repetidas e invertidas, que al doblarse sobre sí misma, forma una doble hebra con las secuencias invertidas ahora complementarias y un doblez en forma de “rizo” en un extremo (Figuras 2 y 3). Posteriormente, el complejo *Drosha* (*Drosha-DGCR8* en mamíferos, *Drosha-Pasha* en *Drosophila*, 37) escinde el pri-miRNA y produce el miRNA precursor o pre-miRNA (~ 70 nucleótidos) con estructura de “hairpin”, un grupo fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos no pareados en el extremo 3'.³⁵⁻³⁷ A continuación, el pre-miRNA es transportado al citoplasma por el complejo transportador nuclear exportin-5-RanGTP.³⁹ En el citoplasma, Dicer escinde el pre-miRNA cerca del “rizo” para producir finalmente el miRNA maduro

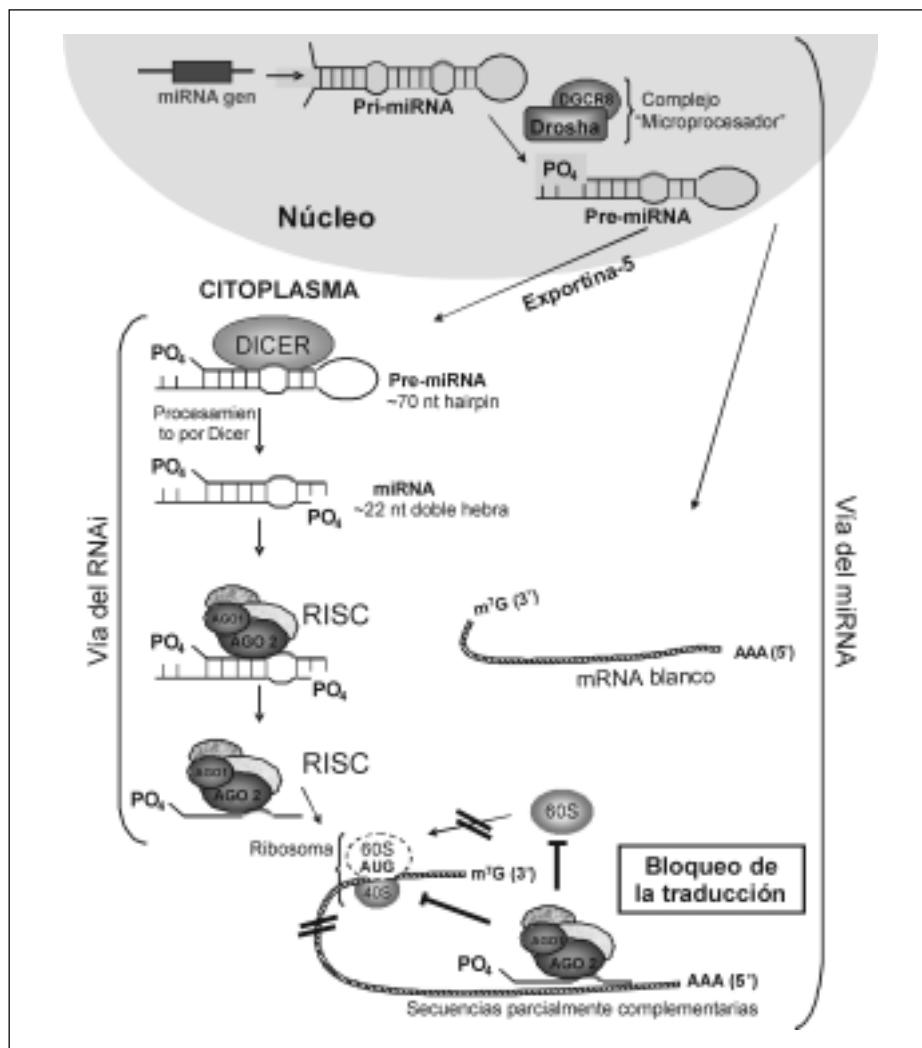


Figura 2. Mecanismo de RNAi mediado por miRNAs. En el núcleo celular, el gen que codifican para el microRNA (miRNA) es transcrita por una RNA polimerasa II para producir el precursor miRNA primario o pri-miRNA (60-100 nucleótidos) con una estructura de "hairpin". El pri-RNA es procesado por el complejo Drosha-DGCR8 (en humanos) para formar el precursor miRNA o pre-miRNA (~70 nucleótidos) con estructura de "hairspin", un grupo fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos no pareados en el extremo 3'. El pre-miRNA es transportado al citoplasma a través de la exportin-5-RanGTP. En el citoplasma, Dicer escinde el pre-miRNA para producir el miRNA maduro de ~22 nucleótidos, el cual es reclutado por el complejo RISC. Los componentes conocidos de RISC en humanos incluyen las proteínas de unión a dsRNA Argonauta 1 y 2 (AGO). El miRNA se une al extremo 3' del mRNA blanco reconociendo secuencias parcialmente complementarias e inhibe la traducción del mismo. El mecanismo de inhibición de la traducción no se conoce con exactitud. Evidencias recientes indican que el miRNA inhibe el inicio de la traducción del mRNA al bloquear el reclutamiento de la subunidad 60S del ribosoma durante el proceso de traducción.

de ~ 22 nucleótidos, el cual es reclutado por el complejo RISC. Una vez incorporado al complejo RISC, el miRNA se une al extremo 3' del mRNA blanco reconociendo secuencias *parcialmente* complementarias o "imperfectas" (reconocimiento parcial donde no todas las secuencias son complementarias) e inhibe la traducción del mismo.^{22,23,40} En vertebrados, dicho reconocimiento requiere únicamente de una perfecta complementariedad entre el mRNA y la región 5' del miRNA conocida como "seed" (por su descripción en inglés), la cual abarca 2-7 nucleótidos.^{41,43} El mecanismo por el cual los miRNAs inhiben la traducción no se conoce con exactitud. En 2008, Novina, *et al.*⁴⁸ reportaron que el miRNA inhibe el inicio de la traducción del mRNA al bloquear el reclutamiento de la subunidad 60S del ribosoma durante el proceso de traducción. Algunas eviden-

cias indican que el miRNA podría también degradar directamente al mRNA blanco dentro de los compartimentos citoplasmáticos conocidos como "compartimentos de procesamiento" o "compartimentos-P" ("P-bodies", por su descripción en inglés).⁴⁹ Una revisión detallada de la biogénesis y mecanismos de silenciamiento de siRNAs y miRNAs se encuentra en la referencia 50.

- **Mirtrones y hpRNAs.** Recientemente, se consideraba que los miRNAs eran derivados de transcriptos endógenos (plantas, invertebrados y mamíferos) que requieren forzosamente de la acción del complejo Drosha y de Dicer (vía de miRNAs), mientras que los siRNAs eran derivados exclusivos de dsRNA largos exógenos procesados por Dicer (vía del RNAi) en plantas e invertebrados. Sin embargo, los últimos hallazgos revelaron no sólo la existencia de una vía alterna en la

A. Uso de siRNAs sintéticos, siRNA con estructura de "hairpin" (shRNAs).			
	siRNA	shRNA/vector-plásmido	shRNA/vector lentiviral o retroviral
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de sintetizar • Fácil de usar 	<ul style="list-style-type: none"> • Estable expresión del siRNA con mayor tiempo de duración del "silenciamiento" 	<ul style="list-style-type: none"> • Estable expresión del siRNA con mayor tiempo de duración del "silenciamiento". • Son introducidos a prácticamente cualquier tipo de célula mediante infección.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Poco tiempo del "silenciamiento". • Difíciles de usar en células difíciles de transfectar como cultivos primarios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Difíciles de usar en células difíciles de transfectar como cultivos primarios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor tiempo para obtener las células de interés. • Medidas de bioseguridad (nivel II) para la recolección de las pseudo-partículas virales e infección de las células blanco.

B.

- siRNA

```

graph LR
    A[Diseñar siRNAs] --> B[Sintetizar siRNAs]
    B --> C[Introducir siRNAs a la célula blanco]
    C --> D[Verificar grado de siRNAs silenciamiento]
  
```

- shRNA/vector-plásmido

```

graph LR
    A[Diseñar shRNAs] --> B[Sintetizar shRNAs (1)]
    B --> C[Clonar shRNA dentro vector-plasmido (2)]
    C --> D[Introducir Vector-plasmido-shRNA a la célula blanco o transfección (4)]
    D --> E[Verificar grado de silenciamiento]
  
```

- shRNA/vector lentiviral o retroviral

```

graph LR
    A[Diseñar shRNAs] --> B[Sintetizar shRNAs (1)]
    B --> C[Clonar shRNA dentro del lenti-vector/retro-vector (2)]
    C --> D[Producción de pseudo partículas virales (3)]
    D --> E[Infección de la células blanco (4)]
    E --> F[Verificar grado de silenciamiento]
  
```

Figura 3. Inducción de RNAi en células de mamíferos. A. Ventajas y desventajas del uso de siRNAs sintéticos, siRNA con estructura de "hairpin" (shRNAs) expresados en vectores-plásmidos y shRNAs expresados en vectores virales. B. Diagrama de trabajo simplificado de cada método. (1) El diseño debe incluir los sitios de restricción del vector-plásmido o lenti-vector/retro-vector. (2) Transformación de bacterias competentes con el vector-plásmido-shRNA o lenti-vector-shRNA/retrovector-shRNA para la producción de cantidades suficientes del vector usado posteriormente para la transfección o producción de partículas virales respectivamente. (3) Incluye la co-transfección del lenti-vector-shRNA con plásmidos para el empaquetamiento y envoltura de la pseudo partícula viral usando células productoras y la posterior recolección del sobrenadante del cultivo contenido las pseudo partículas virales. Uso de campana de bioseguridad nivel II como mínimo. (4) Incluye la selección de las células *transfectadas* o *infectadas* mediante la detección de marcadores (como la molécula verde fluorescente GFP) o mediante la resistencia a un antibiótico (como neomicina).

biogénesis de miRNAs (precursores "Mirtrones"),^{51,52} sino la existencia de una nueva vía de biosíntesis de siRNAs provenientes de dsRNA largos de origen endógeno ("hpRNAs").⁵³

Los mirtrones ("Mirtrons" en inglés) son precursores dsRNA con estructura de "hairpin" semejante al precursor pre-miRNA, que provienen de secuencias cortas de intrones que sufren un proceso de "empalme y corte" o "splicing" (en inglés). Los mirtrones no requieren de la acción del complejo Drosha y son exportados directamente al citoplasma por el complejo transportador nuclear exportina-5, donde son incorporados a la vía del miRNA.⁵² Su existencia ha sido confirma-

da en *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* y células pluripotenciales embrionarias de ratón.⁵¹⁻⁵³ siRNA endógenos pueden ser generados a partir de transcritos con secuencias repetidas invertidas que al doblarse forma un "rizo" o "hairpin" (hpRNAs) a semejanza de un miRNA, pero son más largos y no requieren del procesamiento por el complejo Drosha. Su existencia ha sido confirmada en *Drosophila*, oocitos de ratón y células pluripotenciales embrionarias de ratón.⁵³⁻⁵⁵ A partir de esos hallazgos, el adjetivo "canónico" ha sido utilizado para describir el componente "clásico" de una vía previamente descrita, por ejemplo: miRNAs canónicos ("canonical miR-

NAs” en inglés) requieren del procesamiento por el complejo Drosha.

RNAi COMO HERRAMIENTA PARA EL “SILENCIAMIENTO” DE GENES

La inhibición artificial de la expresión de genes mediante RNAi es conocido como “silenciamiento” o “knocking down” debido a que la inhibición no es total, a diferencia del “knocking out” donde el gen es eliminado completamente del genoma.

Usando la información acerca del RNAi en mamíferos, se desarrollaron los siguientes métodos para el “silenciamiento” de genes:

- El uso de siRNAs sintéticos de 21 nt introducidos directamente a la célula mediante transfección o electroporación.

- El uso de RNAs “pequeños” con estructura de “hairpin” (shRNA o “short hairpin RNA”) expresados en vectores-plásmidos, introducidos a la célula mediante transfección o electroporación.
 - El uso de shRNA expresados en vectores de expresión virales, introducidos a la célula mediante infección con pseudo-partículas virales.

El método a escoger depende de dos factores: la duración del efecto de silenciamiento que se requiera y el tipo de células que se desea trabajar. El uso de siRNA sintéticos induce un silenciamiento de tres a siete días, por lo que es el método adecuado para ensayos cortos. Si se requiere de ensayos de larga duración, el método más adecuado sería el uso de shRNA expresados en plásmidos-vectores y si se requiere trabajar con células difíciles de transfectar y un silenciamiento prolongado el método de opción

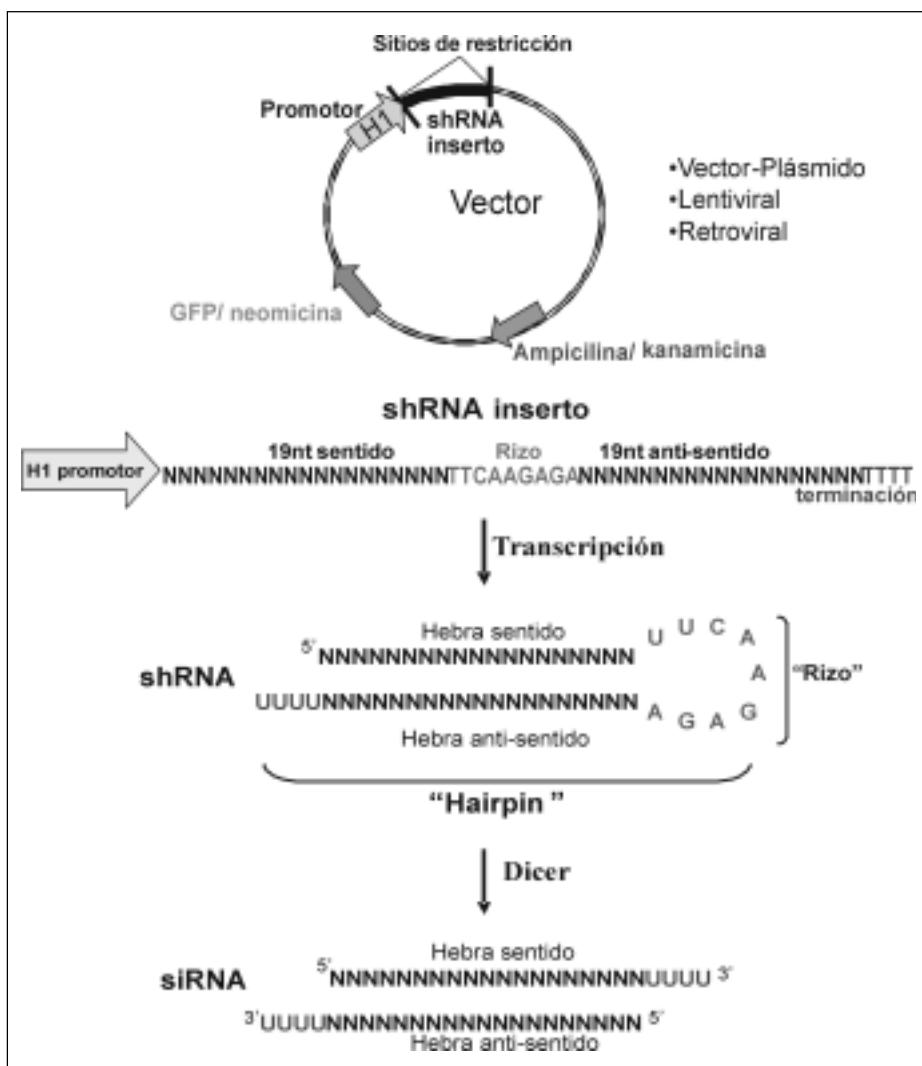


Figura 4. Generación de shRNAs expresados en vectores de expresión. Los vectores de expresión son derivados de plásmidos o de lentivirus/retrovirus. Estos presentan generalmente: a) sitios de restricción específicos donde se inserta el shRNA; b) un promotor eucariótico de polimerasa para la expresión del shRNA; c) un marcador o resistencia a antibióticos para la selección de las células que contenga el vector, y d) resistencia a ampicilina/kanamicina para la selección de bacterias transformadas con el vector. Los shRNA son sintetizados a partir de una sola hebra que codifica para la secuencia sentido (19nt), seguido de 5-10 nt que forman la estructura de "rizo" y la secuencia anti-sentido complementaria de 19-29 nt. La hebra es clonada (insertada) dentro del vector de expresión, introducida a la célula y transcrita mediante el promotor eucariótico de polimerasa III (Pol III) como el H1 y U6. Los shRNAs son entonces procesados por Dicer, para producir los siRNAs y desencadenar el mecanismo de RNAi. GFP=proteína verde fluorescente.

Cuadro 1. Sitios en la red para el diseño de si/shRNAs.

Ambion	www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html
Dharmacon	www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx
Qiagen	www1.qiagen.com/Products/GeneSilencing?CustomSiRna/SiRnaDesigner
Invitrogen	rnaidesigner.invitrogen.com/mailexpress/
Integrated DNA Technologies	www.idtdna.com/Scitoools/Applications/RNAi/RNAi.aspx/
Sfold Algorithm	sfold.wadsworth.org/sirna.pl
Tuschl Lab	www.rocketfeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html
White head Institute	jura.wi.mit.edu/siRNAAext
SDS (siRNA Design Software)	i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php
BIOPREDSi	www.biopredsi.org/star.html
siDE	side.bioinfo.ochoa.fib.es/

sería el uso de shRNA expresados en vectores virales. Una excelente guía para escoger el método a usar se encuentra en el sitio www.ambion.com/RNAi en su manual “RNA interference Research Guide”. La figura 3 incluye un resumen de las ventajas y desventajas de cada método, así como un diagrama de trabajo simplificado de cada uno de ellos.

siRNA sintéticos

siRNA son fácilmente sintetizados y fáciles de usar. La desventaja es el corto tiempo de duración del silenciamiento y que no resulta fácil introducirlos en células difíciles de transfectar como los cultivos primarios. Pueden ser el método de elección ya que la mayoría de los experimentos son completados en tres a siete días. Este periodo depende del grado de proliferación de la célula blanco, entre mayor sea el nivel de proliferación, el “silenciamiento” durará menos.

El primer paso en la selección del siRNA comienza con la secuencia del mRNA del gen de interés y la selección del programa para el diseño de la hebra sentido y antisentido del siRNA (que formarán el siRNA “dúplex”). Los programas disponibles constan de algoritmos basados en las características comunes de los siRNA funcionales estudiados. Algunos programas incluyen algoritmos que consideran la estructura secundaria y accesibilidad del mRNA blanco. Dichos programas predicen varias secuencias probables de siRNA o candidatos y cada uno debe examinarse para eliminar aquéllos con secuencias homólogas a genes no deseados, para lo cual se sugiere el uso de programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). La mayoría de los programas para diseñar siRNAs incluyen un programa capaz de realizar tal análisis, por lo que se recomienda verificar las características y capacidades del programa para escoger el más conveniente (Cuadro 1).⁵⁶⁻⁵⁷ Efectividad (potencia) estabilidad y especifici-

dad del siRNA es lo que se persigue en su diseño. Lo anterior incluye evitar la activación de la respuesta inmune innata mediada por receptores tipo Toll (TLRs), la activación de la respuesta mediada por interferones y la afectación de mRNAs de genes no relacionados (“Off targets”). Entre las características comunes que comparten los siRNA efectivos y estables se encuentran: tamaño del siRNA dúplex, secuencia asimétrica de siRNA dúplex, localización preferencial de nucleótidos y estabilidad termodinámica. (Cuadro 2).⁵⁸⁻⁶⁴ Adicionalmente, modificacio-

Cuadro 2. Criterios para el diseño de siRNAs.⁵⁸⁻⁶⁴

Criterio
Tamaño y secuencia asimétrica <ul style="list-style-type: none">• 19 nt complementarios y 2 nt no pareados en el extremo 3' de cada hebra.
Estabilidad: Contenido de G + C (bajo a medio) <ul style="list-style-type: none">• 30-52%
Posición preferente para un nucleótido <ul style="list-style-type: none">• U o A en posición 1• C o G en posición 19• U en posición 17• A en posición 19• A en posición 3• U en posición 10
Especificidad <ul style="list-style-type: none">• Verificar homologías en la secuencia del siRNA con blancos no deseados (“Off-targets”) usando los programas Blast o Smith-Waterman durante el proceso de selección.• Evitar las secuencias motivo conocidas que puedan activar la respuesta inmune innata a través de los receptores tipo-Toll (TLRs).^{62,63}
Estabilidad en la síntesis química <ul style="list-style-type: none">• Se evitan las secuencias con pares alternados GC (más de 7).

Reynolds, et al.,⁵⁸ Huesken,⁵⁹ Shabalina,⁶⁰ Takasaki,⁶¹ Amarzguioui,⁶² Judge,⁶³ Hornung.⁶⁴

nes químicas artificiales son frecuentemente incluidas en el diseño del siRNA con la finalidad de incrementar su estabilidad sin afectar su efectividad.⁶⁵⁻⁶⁶

Se recomienda diseñar y probar el grado de silenciamiento de al menos cuatro tipos diferentes siRNAs (cuatro hebras sentido distintas con sus respectivas cuatro hebras anti-sentido), ya que no existe 100% de garantía en el diseño de siRNAs eficientes y específicos aun cuando cumplan con las características de diseño conocidas.

Una vez diseñadas, la síntesis química de la hebra sentido y anti-sentido puede ser ordenada a varias compañías como "síntesis de oligonucleótidos" (IDT, www.idtdna.com; Dharmacon, www.dharmacon.com; Ambion, www.ambion.com/RNAi). Generalmente se ordena la síntesis de oligonucleótidos de-salinizados ("desalted purified oligonucleotides"), a una concentración de 50-100 nM. La purificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) de dichos oligonucleótidos no es necesaria. Una vez recibidos, se requiere unir ambos oligonucleótidos para formar el RNA de doble hebra (dúplex) mediante un procedimiento conocido como alineación ("annealing" por su descripción en inglés), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez unidas, pueden ser usadas para introducirlas a la célula de interés.

Varias compañías ofrecen el diseño y la síntesis de siRNAs listos para ser transfectados (3-4 siRNAs dúplex diferentes) e incluso la garantía de 50-70% de silenciamiento con al menos uno de ellos (Dharmacon, "SMARTpool reagent" www.dharmacon.com/sigenome; Ambion, "Silencer pre-designed siRNAs/Validated siRNAs" www.ambion.com/RNAi). El costo final de este servicio no resulta barato, pero la garantía del funcionamiento y el ahorro de tiempo/trabajo justifican completamente el gasto. Esta alternativa es ampliamente recomendada por el autor.

Finalmente, los siRNAs pueden ser introducidos directamente a las células (transfección) usando reactivos basados en lípidos catiónicos o poliaminas (RNAiFect de Qiagen, Oligofectamine de Invitrogen, siPORT NeoFX de Ambion). Este método es eficiente en el caso de células inmortalizadas adherentes, pero no para células en suspensión y recién purificadas (cultivos primarios). El método de elección en este último caso es la electroporación ("electroporation", en inglés), la cual consiste en la apertura de poros en la membrana celular mediante la aplicación de pulsos eléctricos. Este procedimiento puede comprometer severamente la viabilidad celular y se recomienda optimizar las condiciones del procedimiento para evitar un alto grado de muerte celular. Por lo general, esto se logra siguiendo las recomendaciones

de las compañías que ofrecen los aparatos y/o amortiguadores para electroporación.

Es importante señalar que la eficiencia en la transfección determina que el silenciamiento del gen de interés sea detectado. Una eficiencia de transfección de 50% sólo permitirá la detección de silenciamiento, aun cuando el siRNA sea altamente eficiente. Por lo anterior, el uso de controles positivos se recomienda (ver sección "controles"). El uso de shRNAs insertados en vectores de expresión puede ser una alternativa para verificar la eficiencia de la transfección.

shRNA

Para incrementar la duración del silenciamiento por RNAi, se desarrollaron vectores de expresión conteniendo promotores de RNA polimerasa para la transcripción de siRNA dentro de propia célula. Los vectores de expresión son derivados plasmídicos o de virus que son introducidos a las células de manera estable y son transmitidos a través de varias generaciones. Se ha observado que el uso de shRNAs que imitan la estructura de los miRNAs y que son expresados en dichos vectores, es una estrategia eficiente para la inducción del RNAi. Los shRNAs son sintetizados a partir de una sola hebra que codifica para la secuencia sentido (19 nt), seguido de 5-10 nt que forman la estructura de "rizo" y la secuencia anti-sentido complementaria de 19-29 nt (Figura 4). La hebra es insertada (clonada) dentro del vector de expresión, el vector es introducido a la célula y el shRNA es transcrita mediante un promotor eucariótico de polimerasa, como los ampliamente usados promotores de polimerasa III (Pol III) H1 y U6. Los shRNAs son entonces procesados por Dicer para producir los siRNAs. Los promotores de Pol III inducen la transcripción en el residuo +1 del transcripto y la termina en el segundo residuo continuo a una secuencia de 4-5 timidinas (T), produciendo una secuencia terminal de uridinas (U). Los promotores Pol III son activos en todo tipo de célula eucarióticas, permitiendo la expresión constitutiva de los shRNAs.

- **Vectores de expresión plásmidos.** Varios plásmidos han sido desarrollados como vectores de expresión (Ambion, Sigma, Qiagen, Clontech). Los elementos importantes de un vector de expresión son:
 - a) El tipo de promotor.
 - b) El sitio de inserción del shRNA.
 - c) La expresión de marcadores (ejemplo, la pro-

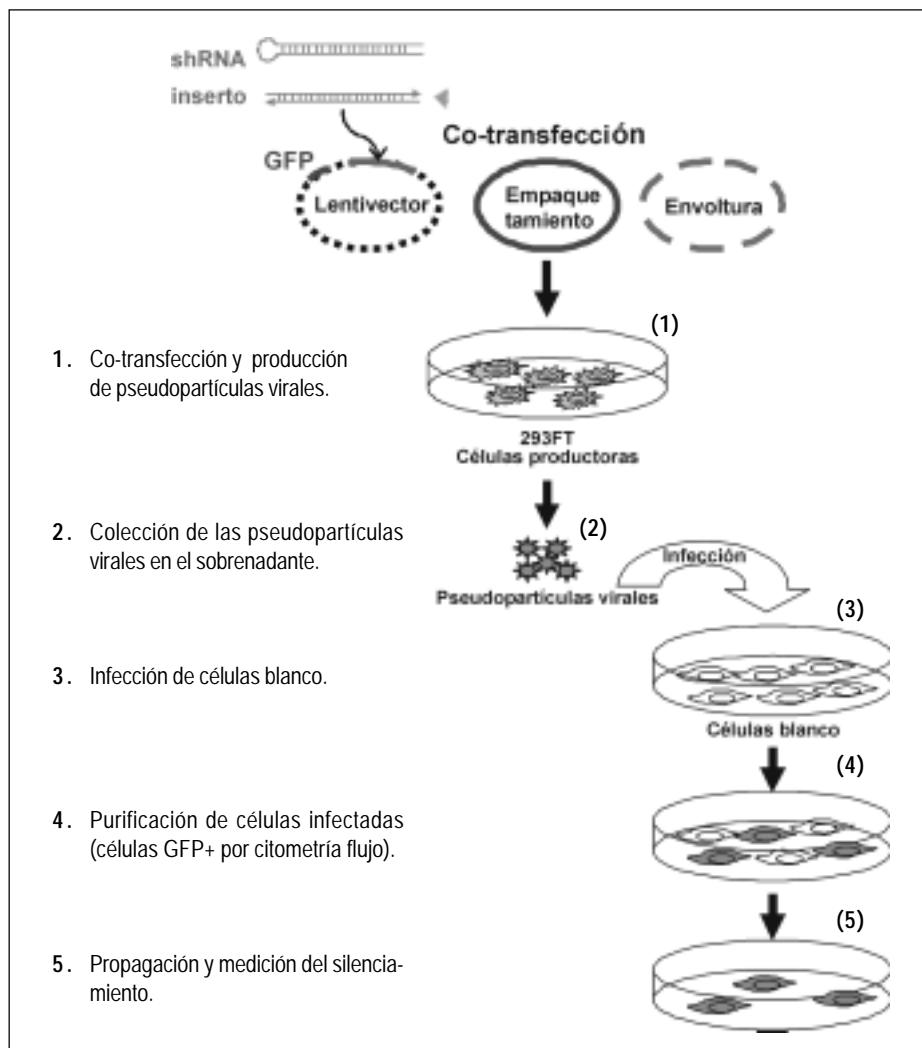


Figura 5. Inducción de RNAi usando vectores de expresión lentivirales. Los pasos generales incluyen la clonación del shRNA dentro del vector lentiviral, seguido por la co-transfección del vector lentiviral-shRNA y los plásmidos para el empaquetamiento y la envoltura viral en células productoras. Las células productoras (293F, 293FT) son generalmente derivadas de la línea celular 293T (célula de riñón embrionario humano). Las células productoras secretan las pseudo-partículas virales en el medio de cultivo, las cuales son recolectadas y usadas para infectar a las células blanco. Únicamente el vector lentiviral-shRNA es incorporado al DNA genómico por transcripción inversa, perdiendo la capacidad de replicación. Las células que contienen el vector lentiviral-shRNA pueden ser seleccionadas mediante marcadores como la proteína verde fluorescente (GFP) codificada en el vector.

teína verde fluorescente o GFP) o bien genes de resistencia a antibióticos (ejemplo, neomicina), que permitan la selección de las células blanco que contengan el vector

- d) Si presenta un promotor que requiera de la presencia de un antibiótico para inducir la expresión del shRNA (sistema condicionado o inducible).

Los vectores-plásmidos son introducidos a las células mediante reactivos basados en lípidos o poliaminas o bien electroporación, por lo que son difíciles de introducir en células difíciles de transfectar. Los requerimientos particulares del experimento dictarán el mejor vector a usar. Se recomienda verificar la característica del vector (principalmente inciso a-d), su accesibilidad, si se requiere el uso forzoso de "kits" de la misma compañía para garantizar su

función y si éste ha sido utilizado con éxito en trabajos publicados.

- **Vectores de expresión virales.** Los vectores de expresión virales son vehículos efectivos para la expresión estable y a largo plazo del shRNA al ser integrados al genoma de la célula blanco.^{67,68} Cuando estos vectores son empaquetados dentro de pseudo-partículas virales, es posible introducirlos prácticamente a cualquier tipo de célula mediante infección. Dos tipos de vectores han sido desarrollados: Los vectores derivados de oncoretrovirus o retrovirales desarrollados a partir del virus Moloney de la leucemia murina ("Moloney murine leucemia virus, MMLV") o bien a partir del virus de células madre murino ("murine stem cell virus, MSCV"); y los vectores lentivirales desarrollados a partir del virus de la inmunodeficien-

cia humana-1 (“human immunodeficiency virus-1, HIV-1”), que también pertenecen a la familia de los retrovirus. Una diferencia importante entre ellos radica en que los vectores retrovirales (*u oncoretrovirus*) sólo infectan células dividiéndose activamente por mitosis, a diferencia de los vectores lentivirales que son capaces de infectar células con y sin actividad mitótica.^{69,70}

Los vectores virales presentan los elementos de un vector plasmídico mencionados en los incisos **a-d**, además de las características mostradas a continuación:

- **Vectores lentivirales.** El shRNA es insertado en el vector lentiviral (shRNA-vector lentiviral), el cual contienen los elementos genéticos para la transducción, integración y expresión dentro del DNA genómico de la célula blanco. Las pseudo-partículas virales son generadas en células productoras por co-transfección transitoria del shRNA-vector lentiviral, plásmido de empaquetamiento y plásmido de envoltura (Figura 5). El segundo contiene la información para la transcripción y empaquetamiento de un RNA copia del shRNA-vector lentiviral dentro de la pseudo-partícula viral. El tercero contiene la información para la síntesis de la envoltura membranal, la cual es esencial para la capacidad de infección. Las pseudo-partículas virales son secretadas al medio de cultivo, recolectadas y posteriormente usadas para infectar las células blanco. Dentro de la célula blanco ocurre la transcripción inversa de la información contenida en el shRNA-vector lentiviral y la integración al DNA genómico. Posterior a la integración genómica ocurre la expresión del shRNA (y del marcador en su caso), y la capacidad de replicación viral se pierde debido a que genes estructurales están ausentes y los LTR virales están diseñados para auto-desactivación. Los LTRs (“long terminal repeats”) son los promotores virales que contienen toda información para la expresión genética de los retrovirus.
- Existen varias compañías que ofrecen sistemas retro y lentivirales (Clontech, www.clontech.com; Invitrogen, www.invitrogen.com; System Biosciences SBI, www.systembio.com; Tronolab www.tronolab.epfl.ch/www.lentiweb.com). La información necesaria para desarrollar dichos sistemas se encuentra en cada manual del usuario (“User Manual”) de toda compañía.
- El manejo de vectores virales requiere el uso de medidas de bioseguridad nivel 2 (www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4s3.htm, <http://bmbl.od.nih.gov/> contents.htm) Es necesario verificar los estatutos de bioseguridad aplicados al uso de lentivirus o retrovirus de la institución donde trabaje.
- Por ultimo, la eficiencia en la transfección o infección del shRNA también determina que el efecto en el silenciamiento del gen de interés pueda ser detectado. Pero a diferencia del uso de siRNAs, los vectores de expresión ofrecen la posibilidad de la introducción de un “marcador” o “reportero” que permita verificar que el shRNA haya sido introducido a la célula de interés. Asimismo, un “marcador” puede ser utilizado para purificar las células transfectadas o infectadas (Figura 5).
- **Recomendaciones (shRNA-vectores).** Se recomienda usar el GFP como marcador, ya que permite verificar la eficiencia de la transfección/infección y además permite la purificación de las células transfectadas/infectadas (Figura 5). Este tipo de purificación requiere de menor tiempo que la purificación basada en la inserción de un gen para la resistencia a un antibiótico. Este último requiere del cultivo de las células transfectadas/infectadas en presencia del antibiótico y del pase consecutivo a medio de cultivo nuevo adicionado con el antibiótico hasta que sólo las células resistentes sobrevivan.
- Por otro lado, si el gen de interés es esencial para la sobrevivencia de la célula o simplemente se desea controlar la expresión del shRNA, se recomienda el uso de los sistemas inducibles.^{71,72} Compañías como Clontech ofrecen vectores de expresión inducibles con las instrucciones necesarias para su uso.
- **Controles.** Un control negativo (siRNA/shRNA control negativo) no presenta una secuencia complementaria a ningún mRNA existente en el organismo de interés. Éste debe ser utilizado para descartar efectos no específicos en la expresión del gen blanco, causado por el procedimiento de introducción siRNA/shRNA. El control negativo *debe* ser utilizado en cada experimento realizado y debe usarse para comparar los niveles de silenciamiento del gen blanco (ver monitoreo del grado de silenciamiento, abajo). Varias compañías ofrecen siRNAs/shRNAs controles negativos (Qiagen, www1.qiagen.com/GeneGlobe/siRNA-ControlView; Ambion, www.ambion.com/RNAi). Se recomienda el uso de un control positivo para verificar las condiciones óptimas de la transfección o infección. Éste resulta muy importante en el caso de los siRNAs, ya que podría ser la única manera de verificar que la eficiencia de la transfección es efectiva.

fección sea suficiente para observar el efecto de silenciamiento. Un siRNA/shRNA control positivo presenta una secuencia complementaria al mRNA de un gen constitutivo en la célula de interés.

- **Monitoreo del grado de silenciamiento.** El grado de silenciamiento se determina midiendo la disminución de los niveles del mRNA blanco, o bien, la disminución de los niveles de la proteína blanca. En general, el silenciamiento se considera válido cuando ocurre una disminución sustancial de los niveles de expresión del gen de interés mientras que no existe disminución alguna en la expresión de un gen control.

El PCR tiempo real es el método de elección para medir los niveles del mRNA. Este método sensible y cuantitativo mide los niveles del mRNA blanco en las células transfectadas/infectadas con el siRNA/shRNA de interés y los compara con los niveles del mRNA blanco en las células transfectadas/infectadas con el siRNA control. Además, este método requiere de la determinación de los niveles de mRNA de un gen constitutivo (tubulina, actina, etc.), el cual funciona como gen control cuya expresión no debe ser afectada.

Compañías como Ambion y Applied Biosystem ofrecen las sondas pre-diseñadas o “primers” (www.ambion.com/RNAi) y con garantía de funcionamiento. Por otro lado, las sondas pueden diseñarse o simplemente pueden obtenerse de los bancos de secuencias disponibles en la red (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) y solicitar su síntesis a la compañía de elección (Sigma es buena opción, www.sigma-aldrich.com), lo cual disminuye mucho los costos.

El grado de silenciamiento puede ser medido a nivel proteico, para lo cual existen varios métodos como el *Western blot*, inmunofluorescencia y citometría de flujo. Todos son métodos perfectamente estandarizados y de uso común en el laboratorio.

APLICACIONES: DE HERRAMIENTA EN LA INVESTIGACIÓN BÁSICA AL DESARROLLO DE UN AGENTE TERAPÉUTICO

Existe una relación estrecha entre la investigación básica y el área clínica. La investigación básica permite el descubrimiento de los mecanismos o factores responsables de alguna enfermedad, proporcionando no sólo los posibles blancos para una terapéutica, sino también las herramientas

para el desarrollo de la misma. El área clínica proporciona la experiencia y conocimientos para el diagnóstico de enfermedades y la capacidad para aplicar tratamientos a seres humanos.

En teoría, el RNAi podría ser aplicado como tratamiento de enfermedades asociadas a la expresión o sobre-expresión de un gen conocido. El efecto esperado es detener o disminuir el mecanismo generador de la enfermedad, produciendo efectos secundarios tolerables o bien ninguno.

Así pues, la investigación básica ha señalado como posibles blancos para terapia a productos de genes involucrados en ciclo celular, apoptosis, motilidad celular, transducción de señales, estrés oxidativo, desarrollo, etc. Lo anterior dio lugar a estudios pre-clínicos en modelos murinos y en primates no-humanos que incluyen el tratamiento de infecciones virales,^{73,74} enfermedades oculares,⁷⁵⁻⁷⁶ desórdenes neurodegenerativos,^{77,78} cáncer⁷⁹⁻⁸⁰ e infecciones por VIH.⁸¹ Más aún, los avances logrados en dichos estudios ya fueron trasladados al campo de las pruebas clínicas en fase I, II y III en humanos (ver sección “pruebas clínicas”). El avance tan rápido del uso de RNAi en pruebas de fase clínicas no tiene precedente y los resultados obtenidos son alentadores.

La siguiente sección del manuscrito describe las estrategias desarrolladas en la aplicación del RNAi para el tratamiento de enfermedades en organismos vivos y los requerimientos especiales que tuvieron que ser resueltos para dicho fin. Finalmente, el manuscrito incluye las pruebas clínicas que se llevan a cabo actualmente en el tratamiento de enfermedades humanas.

Estrategias para la aplicación del RNAi en la terapéutica

Dos estrategias principales han sido desarrolladas: el uso de siRNA sintetizados químicamente y el uso de shRNA insertados en vectores virales (shRNA-vector viral). Cada una presenta sus ventajas y desventajas: Los siRNAs pueden ser modificados químicamente para incrementar su estabilidad y su eficacia para el silenciamiento. Aunado a lo anterior, el tratamiento con siRNAs puede ser detenido en cualquier momento al suspender su administración. Sin embargo, el efecto del siRNA es transitorio y además resulta difícil diseñar un método efectivo de liberación del siRNA a la célula o tejido blanco (ver sección “Sistemas de liberación...siRNA”, abajo). Por otro lado, el shRNA en un vector viral es sintetizado constantemente dentro del organismo infectado, pro-

duciendo un silenciamiento prolongado. Importante-mente, el shRNA puede ser liberado efectivamente en la célula o tejido blanco al usar vectores provenientes de virus con receptores específicos para tales blancos. Una desventaja es que el tratamiento no puede ser detenido, ya que el shRNA-vector viral permanecerá dentro del organismo a lo largo de su vida.

El uso de siRNA/shRNAs en organismos vivos como tratamiento para una enfermedad, implica que éstos puedan ser usados como “drogas” potentes, estables, específicas y seguras. El diseño de siRNAs/shRNAs potentes, estables y específicos sigue los principios ya mencionados en secciones anteriores. Sin embargo, la administración *in vivo* (en organismos vivos) de dichos siRNA/shRNAs presenta implicaciones particulares que deben ser resueltas. En primer lugar, los siRNAs pueden ser degradados por ribonucleasas endógenas en su camino a la célula o tejido blanco, por lo que se requiere del uso de siRNAs particularmente resistentes o estables. En segundo lugar, evitar la activación de la respuesta inmune mediada por interferones o por TLRs es particularmente importante al administrar los siRNAs a un mamífero. En este caso, la introducción de modificaciones químicas al diseño del siRNA (ver modificaciones químicas, abajo) se suma a la eliminación de las secuencias motivo que activan dicha respuesta inmune. En tercer lugar, la administración segura de los siRNA/shRNAs debe ser verificada rigurosamente, lo cual incluye el uso de vehículos de liberación de siRNAs no tóxicos (ver métodos liberación, abajo). En el caso particular de los shRNAs, la saturación de los mecanismos endógenos de silenciamiento debe ser evitada (ver sección abajo). Por último, la aplicación del RNAi en la terapéutica requiere forzosamente que los siRNA/shRNAs administrados puedan llegar a la célula o tejido blanco para lo cual fueron diseñados. Precisamente, el desarrollo de métodos efectivos para la liberación local o sistémica de siRNA/shRNAs en organismos vivos, se considera el principal problema a resolver en el uso factible del RNAi en la terapéutica.

Por todo lo anterior, el uso del RNAi como tratamiento presenta implicaciones particulares con respecto a su uso en la investigación básica. A continuación se describen los requerimientos particulares del uso del RNAi en la terapéutica.

Modificaciones químicas adicionales del siRNA

El diseño de siRNAs efectivos y estables se basa en las características comunes de los siRNAs funcionales estudiados, como ya fue mencionado en la sec-

ción “siRNAs sintéticos”. Adicionalmente, algunas modificaciones químicas de los siRNAs han sido utilizadas para incrementar la resistencia del siRNA a la degradación *in vivo*. La adición de 2'-*O*-metilpurinas o 2'-*O*-fluoropirimidinas en la posición 2' de la ribosa incrementa la resistencia a la acción de ribonucleasas en suero.⁶⁵ Los siRNAs modificados con 2'-*O*-metilpurinas son más efectivos que sus análogos no modificados en la protección contra el virus de la hepatitis B, *in vivo*.⁶⁶ La adición de 2'-*O*-metilpurinas en la hebra sentido de un siRNA dúplex elimina la activación de los TLRs⁸² y previene la activación del interferón.

Evitar la saturación de los mecanismos endógenos de silenciamiento: cuestión de vida o muerte

Estudios recientes han demostrado que altos niveles de shRNAs inducidos por el uso de promotores potentes en los vectores de expresión, pueden ser letales *in vivo*. Un estudio publicado en 2006⁸³ reportó que la producción de altos niveles de shRNAs en ratones produjo la muerte de 23 de los 49 ratones de experimentación debido a un daño hepático asociado a la disminución de los niveles de miRNAs en el hígado, indicando una interferencia competitiva de la vía del miRNA. Los datos indicaron una saturación del transportador nuclear exportina-5 y la subsiguiente inhibición de la exportación de los precursores pre-miRNAs (vía del miRNA y Figura 2). La solución es el uso de promotores menos potentes que induzcan la producción de niveles de shRNA no tóxicos y con efectos terapéuticos aceptables.^{83,84}

En el caso de los siRNAs, se recomienda usar la menor concentración posible de siRNAs que produzca un efecto terapéutico aceptable para disminuir el riesgo de la saturación de los mecanismos endógenos de silenciamiento.

Sistemas de liberación del siRNA/shRNA *in vivo*

- **siRNA.** Los métodos de liberación desarrollados *in vivo* incluyen la inoculación directa del siRNA en órganos como el ojo, pulmón y sistema nervioso central, o bien, la liberación sistémica de siRNA conjugados a lípidos, polímeros, anticuerpos y recientemente nanopartículas.

La liberación directa de siRNA (en vehículos como solución salina o dextrosa 5%) es relativamente fácil y requiere de bajas concentraciones por lo que resulta muy atractiva como tratamien-

to local, pero no es útil para un tratamiento sistémico. Este método ha sido utilizado con éxito para liberar siRNA en ojo^{75,76} y pulmón.⁸⁵ La liberación sistémica-no-específica de siRNA involucra la inyección intravenosa de siRNAs modificados químicamente (más estables) conjugados a colesterol o encapsulados en bicapas lipídicas conocidas como partículas lipídicas-ácido nucleico estables (SNALPs), los cuales facilitan la liberación a través de endocitosis. Estos dos métodos han sido usados con éxito para liberar los siRNA en hígado e intestino delgado,^{86,87} pero no son apropiados para otro tipo de órganos o tejidos. La alternativa son los métodos de liberación sistémica-específica dirigida a un órgano o tejido particular, los cuales involucran el uso de siRNAs encapsulados en nanopartículas catiónicas conjugadas a ligandos o receptores específicos,⁸⁸ siRNAs unidos al complejo anticuerpos-protamina⁸⁹ y siRNAs fusionados a RNA aptameros.⁹⁰ Como ejemplo, siRNA dirigido contra el producto del gen EWS-FLI1 en un modelo murino de sarcoma metástatico fue protegido con nanopartículas compuestas por ciclodextrina (un oligosácarido cíclico) conteniendo policationes y cubiertas con transferrina, cuyo receptor es expresado en grandes cantidades en las células cancerosas. El tratamiento inhibió considerablemente el crecimiento tumoral.⁹¹

- **shRNA-vectores virales.** Vectores lentivirales han sido usados exitosamente para la liberación de shRNAs en mamíferos: shRNA-vector lentiviral contra la forma activada del oncogene Ras fue usado en ratones para disminuir el crecimiento de células tumorales.⁹² Vectores adenovirales han sido usados para liberar shRNAs al sistema nervioso central, tomando ventaja de la atracción natural del adenovirus hacia las neuronas: shRNA dirigido contra el gen *huntingtin* (el gen mutado causante de la enfermedad de Huntington) fue insertado en un vector adenoviral y usado con éxito en modelos murinos.⁹³ Es necesario advertir que a pesar de las ventajas que ofrece el uso de vectores virales, existe el riesgo potencial de que algunos de ellos estimulen una respuesta inmunológica por sí mismos. Por otro lado, la naturaleza viral de estos vectores los hace susceptibles de sufrir mutaciones, lo cual podría provocar potencialmente una expresión genética alterada.

Pruebas clínicas en humanos

Pruebas clínicas de fase III para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad

de tipo húmeda (AMD) se basan en la inyección intravital de Cand5 (Bevasiranib), un siRNA dirigido contra todas las isoformas del factor de crecimiento vascular endotelial o VEGF (Acuity Pharmaceuticals, comunicado de prensa). Adicionalmente, pruebas clínicas de fase I han sido finalizadas usando la inyección intravital de Sirna-027, un siRNA dirigido contra el receptor 1 del VEGF (Merk-Sirna Therapeutics, San Francisco California, comunicados de prensa). Por otro lado, pruebas clínicas de fase II contra el *virus sincicial respiratorio* (*RSV*), causante de una infección seria respiratoria neonatal, han sido finalizadas usando ALN-RSV01, el cual es un siRNA dirigido contra un gen que codifica para la nucleocápside viral (Alnylam Pharmaceuticals, comunicado de prensa).

Calando Pharmaceuticals (Pasadena California) inició pruebas clínicas de fase I para el tratamiento de tumores sólidos usando un siRNA específico para la subunidad de la ribonucleótido reductasa (RRM2), enzima requerida para la síntesis de DNA. Este estudio es el primero en usar un método de liberación mediante receptores donde el siRNA es encapsulado en ciclodextrina (un oligosácarido cíclico) conjugada a lactoferrina, cuyo receptor es altamente expresado en células cancerosas.

Pruebas clínicas en fase I han iniciado para el tratamiento de linfoma en pacientes con VIH usando shRNA-vector viral contra los exones *tat* y *rev* del VIH. En este estudio, células pluripotenciales infectadas con el shRNA-vector lentiviral han sido transplantadas en cuatro pacientes (The City of Hope Nacional Medical Center, Duarte California, en colaboración con Benitec, Melbourne Australia).

La rapidez de este avance puede deberse a que las compañías farmacéuticas han decidido unir esfuerzos para el desarrollo de terapias basadas en el RNAi y actualmente la colaboración parece ser la práctica común en este campo.

CONCLUSIONES

Actualmente, el RNAi es un método confiable, estandarizado, relativamente rápido y con menor costo que los métodos alternativos como la generación de ratones “knock out”. La inhibición de la expresión de un gen dado (o genes) proporciona al investigador un modelo contundente para elucidar su posible función. Las ventajas y aplicación de esta herramienta deben ser difundidas para que un número mayor de investigadores visualice la posibilidad de implementar el RNAi en su laboratorio.

Aunado a lo anterior, la aplicación del RNAi como agente terapéutico ofrece un campo prometedor y novedoso para aquellos dedicados al área médica-clínica.

REFERENCIAS

1. 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: 806-11.
2. Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 1997; 276: 1558-60.
3. Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 1998; 10: 937-46.
4. Angell SM, Baulcombe DC. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J* 1997; 16: 3675-84.
5. Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 1992; 22: 3343-53.
6. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.
7. 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; 101: 25-33.
8. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200.
9. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-6.
10. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001; 107: 309-21.
11. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that RNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathway. *Mol Cell* 2002; 10: 537-48.
12. Williams BR. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 509-13.
13. Gil J, Alcamí J, Esteban M. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4653-63.
14. Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 2000; 5: 107-14.
15. 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; 411: 494-8.
16. 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; 98: 9742-7.
17. Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D, Samuelsson B, Rådmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J* 2002; 21: 5864-74.
18. Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 340-9.
19. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.
20. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.
21. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-4.
22. Saxena S, Jónsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 44312-9.
23. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9779-84.
24. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-9.
25. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-6.
26. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Bantamencodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113: 25-36.
27. Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13: 790-5.
28. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83-6.
29. Hutvágher G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2000; 293: 834-8.
30. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 438-42.
31. Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res* 2007; 12: 1850-64.
32. Grad Y, Aach J, Hayes GD, Reinhart BJ, Church GM, Ruvkun G, Kim J. Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Mol Cell* 2003; 11: 1253-63.
33. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(Database issue): D154-D158.
34. Grun D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus KC, Rajewsky N. microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput Biol* 2005; 1: e13.
35. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.
36. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9.
37. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.
38. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *C. elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 1999; 2: 671-80.
39. Bohsack MT, Czapinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-91.
40. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-98.

41. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004; 18: 504-11.
42. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
43. Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. Recapitulation on Short RNA-Directed Translation Gene Silencing In Vitro. *Mol Cell* 2006; 22: 553-60.
44. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309: 1573-6.
45. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16961-6.
46. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122: 553-63.
47. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006; 21: 533-42.
48. Wang B, Yanez A, Novina CD. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 5343-8.
49. Liu J, et al. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biol* 2005; 7: 719-23.
50. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.
51. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell* 2007; 130(1): 89-100.
52. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007; 448(7149): 83-6.
53. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 2008; 22: 2773-85.
54. Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* 2008; 453: 803-06.
55. Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 2008; 453: 539-43.
56. Ding Y, Chan CY, Lawrence CE. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: W135-W141.
57. Santoyo J, Vaquerizas JM, Dopazo J. Highly specific and accurate selection of siRNAs for high-throughput functional assays. *Bioinformatics* 2005; 21: 1376-82.
58. Reynolds A, et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 326-30.
59. Huesken D, et al. Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 995-1001.
60. Shabalina SA, Spiridonov AN, Ogurtsov AY. Computational models with thermodynamic and composition features improve siRNA design. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 65-81.
61. Takasaki S, Kotani S, Konagaya A. An effective method for selecting siRNA target sequences in mammalian cells. *Cell Cycle* 2004; 3: 790-5.
62. Amarzguioui M, Prydz H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 1050-8.
63. Judge AD, et al. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 457-62.
64. Hornung V, et al. Sequence-specific potent induction of interferon-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11: 263-70.
65. Czauderna F, et al. Structural variations and stabilizing modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 2705-16.
66. Morrissey DV, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nature Biotechnol* 2005; 23: 1002-7.
67. Barton GM, Medzhitov R. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14943-5.
68. Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2002; 2: 15.
69. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7.
70. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4239-42.
71. Kappel S, Mattess Y, Kaufman M, Strehardt K. Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nature Protocols* 2007; 2: 3257-60.
72. Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods* 2006; 3: 682-8.
73. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005; 11: 50-5.
74. Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM, Lieberman J. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 2006; 439: 89-94.
75. Shen J, et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor. *Gene Ther* 2006; 13: 225-34.
76. Tolentino MJ, et al. Intravitreal injection of VEGF small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate laser-induced model of chroidal neovascularization. *Retina* 2004; 24: 132-8.
77. Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, Guillot S, Haase G, Szulc J, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 2005; 11: 423-8.
78. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004; 10: 816-20.
79. Landen CN Jr, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res* 2005; 65: 6910-8.
80. Hu-Lieskov S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLII by targeted, non-viral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2005; 65: 8984-92.
81. Kumar P, et al. T Cell-Specific siRNA Delivery suppresses HIV-1 Infection in Humanized Mice. *Cell* 2009; 134: 577-86.
82. Robbins M, et al. 2'-O-Methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonist. *Mol Ther* 2007; 15: 1663-9.
83. Grim D, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006; 441: 537-41.
84. An DS, et al. Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol Ther* 2006; 14: 494-505.
85. Bitko V, et al. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Med* 2005; 11: 50-5.

86. Soutschek J, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-8.
87. Zimmermann TS, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006; 441: 111-14.
88. Hu-Lieskovsky S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, non-viral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2005; 65: 8984-92.
89. Song E, et al. Antibody mediated in vivo delivery of siRNA via cell-surface receptors. *Nature Biotechnol* 2005; 23: 709-17.
90. McNamara JO, et al. Cell type-specific delivery of siRNA with aptamer-siRNA chimeras. *Nature Biotechnol* 2006; 24: 1005-15.
91. Hu-Lieskovsky S, Heidel JD, Bartlett DW, Davis ME, Triche TJ. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, non-viral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 2005; 65: 8984-92.
92. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002; 2: 243-7.
93. Huang B, Schiefer J, Sass C, Landwehrmeyer GB, Kosinski CM, Kochanek S. High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of Huntington aggregate load in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2007; 18: 303-11.

Reimpresos:

Dra. Blanca Ortiz-Quintero

Investigador en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Calzada de Tlalpan 4502,
Col. Sección XVI,
14080, México, D.F.
Tel.: 5487-1705
Correo electrónico: boq@iner.gob.mx

Recibido el 24 de noviembre de 2008.

Aceptado el 23 de marzo de 2009.

GLOSARIO

- **RNAi** ("RNA interference"). RNA de interferencia. Mecanismo de inhibición específica de la expresión de genes a nivel post-transcripcional inducido por la presencia de RNA de doble hebra (dsRNA).
- **dsRNA** ("double stranded RNA"). RNA de doble hebra.
- **dsRNA "largos"** ("long dsRNA"). dsRNA de ~500 nucleótidos (nt).
- **siRNA** ("Small interfering RNA"). RNA "pequeños" de interferencia. RNA de doble hebra con un tamaño de 22-25 nucleótidos, 2-3 nucleótidos no pareados en el extremo 3' de cada hebra, un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. siRNAs son producto del procesamiento de los dsRNA "largos" por la enzima Dicer o bien producto de síntesis química.
- **miRNA** MicroRNA. RNAs "pequeños" no codificantes, producidos por la propia célula, que se derivan del procesamiento de precursores RNAs (~70 nucleótidos) con estructura de "hairpin", que inhiben la traducción de mRNA que presentan una secuencia parcialmente complementaria a los miRNAs.
- **"Hairpin"** Estructura que presenta el RNA cuando una hebra con secuencias de nucleótidos repetidas e invertidas se dobla sobre sí misma y forma una estructura de doble hebra con las secuencias invertidas ahora complementarias y un doblez en forma de "rizo" en un extremo (Figura 5). Esta estructura se conoce como "hairpin" por su descripción en inglés.
- **shRNA** siRNA con estructura de "hairpin" ("short hairpin RNA"). Por lo general son expresados en plásmidos o vectores provenientes de virus.
- **"Knocking down"**. Descripción en inglés que indica una disminución en la expresión de un gen mediante RNAi o "silenciamiento".