



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE LOS RNA
DE INTERFERENCIA

Autor: Carmen Barrón García

Tutor: Fernando Escrivá Pons

Convocatoria: Junio 2017

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
DESCUBRIMIENTO DEL RNAi.....	4
OBJETIVOS	5
METODOLOGÍA	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
COMPONENTES DEL SISTEMA RNAI.....	6
1. TIPOS DE RNAi	6
2. ENZIMA DICER	8
3. RISC.....	8
FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL RNAI.....	9
1. INFECCIÓN VIRAL Y LA RESPUESTA INMUNE	9
2. HOMEOSTASIS DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS.....	9
3. CÁNCER	10
LA TECNOLOGÍA DEL RNAi	10
1. MÉTODO DE SILENCIAMIENTO A UTILIZAR	10
• siRNA. Diseño y síntesis de la secuencia del siRNA	10
• shRNA. Uso de vectores.....	11
2. IMPLICACIONES DE LA ADMINISTRACIÓN IN VIVO	11
3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN O ‘DELIVERY’	12
• siRNA.....	12
• shRNA	13
APLICACIONES DEL RNAi. PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	13
1. NUEVAS TERAPIAS ANTIVIRALES.....	14
2. CÁNCER	14
3. OTRAS APLICACIONES	16
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

La interferencia por ARN, ribointerferencia o ARNi es un proceso de silenciamiento génico post transcripcional mediado por moléculas de ARN característico de células eucariotas. Suprimir la expresión de genes específicos tiene gran importancia en procesos de desarrollo y diferenciación celular, cáncer y defensa frente a virus. Actualmente, la interferencia por ARN se muestra como una técnica de biología molecular al alza debido a su gran potencial en cuanto a sus usos terapéuticos. En este sentido, el RNAi es objeto de investigación clínica, con resultados esperanzadores en el tratamiento de infecciones virales, enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

Palabras clave: ARNi, silenciamiento génico, cáncer.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El fenómeno de silenciamiento de genes fue descrito en 1990 por el grupo de investigación de Rich Jorgensen, cuando intentaron aumentar el color púrpura de unas petunias introduciendo un gen clonado que produce el pigmento (1). Los investigadores observaron que al introducir en la planta una copia extra del gen que codifica para la enzima chalcona sintasa, que participa en la producción de pigmentos de antocianina, las flores resultantes tenían colores desde púrpura a blanquecino. Este fenómeno es debido a que tanto el gen introducido como el homólogo endógeno eran suprimidos, y se llamó a este proceso co-supresión génica o silenciamiento génico post-transcripcional (2). Más tarde, científicos de la Universidad de Roma trabajando con el hongo *Neurospora crassa* observaron que al introducir copias adicionales del gen que codifica para su pigmento naranja, los hongos resultantes presentaban tonos blanquecinos. A este fenómeno lo llamaron 'quelling' o supresión (3).

En 1995 el estudiante Sue Guo del laboratorio de Kemphues en la Universidad de Cornell demostró que cuando introducía secuencias en forma de oligonucleótidos antisentido y sentido juntos en el gusano *C. elegans*, la supresión del gen de interés era mayor que cuando introducía los oligonucleótidos sentido o antisentido de forma individualizada (4). A pesar de dejar documentadas sus observaciones, ninguno de los grupos fue capaz de dar una explicación al fenómeno de supresión de genes que observaron en sus experimentos.

DESCUBRIMIENTO DEL RNAI

Aunque existían evidencias previas de que tanto el RNA antisentido como el RNA sentido podían silenciar genes de forma específica, no fue hasta 1998, con la publicación en la revista Nature del artículo de los investigadores Andrew Z. Fire y Craig C. Mello «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*», cuando se presentó el RNAi y se comenzó verdaderamente a entender el fenómeno del silenciamiento de genes (5).

Fire-Mello demostraron el efecto fenotípico del RNA inyectando en las gónadas del gusano *C. elegans* el gen *unc-22* que codifica para una proteína formadora del miofilamento. La disminución en los niveles de expresión de este gen producía un aumento en la curvatura del gusano, mientras que la supresión completa del gen resultaba en mayores defectos estructurales y pérdida de motilidad. Los cambios fenotípicos solamente se producían cuando se inyectaba el RNA sentido y antisentido en forma de RNA de doble cadena (dsRNA), pero no cuando cada RNA era incorporado en forma de cadena sencilla. Además demostraron que la secuencia del RNA a inactivar y la contenida en el RNA bicatenario introducido tenían que ser complementarias para que el silenciamiento fuese específico.

Para explicar más certeramente el silenciamiento llevaron a cabo experimentos de hibridación in situ del gen *mex-3* RNA en gónadas de animales adultos. Observaron que después de añadir RNA bicatenario complementario al abundante gen *mex-3* desaparecía el mensajero, lo que les llevó inicialmente a proponer como hipótesis un efecto a nivel de transcripción o de estabilidad del gen (3). Finalmente la inyección de RNA bicatenario *unc-22* y *gfp-LacZ* en la cabeza o cola de animales transgénicos para la proteína fluorescente GFP, demostró también producir interferencia pronunciada en la progenie y en todos los tejidos, indicando que el RNA bicatenario (dsRNA) fue amplificado.

El estudio de Fire-Mello culmina con la sentencia «la interferencia genética por dsRNA puede ser utilizado por el organismo como proceso fisiológico de silenciamiento génico».

En un estudio posterior, Fire-Mello aportaron evidencias de que el mRNA es el sitio de acción del dsRNA por reconocimiento de las cadenas complementarias entre una molécula lineal de RNA aportado por el dsRNA y el mRNA y que éste mRNA se degrada catalíticamente antes de su traducción en proteínas (6).

En poco tiempo la presencia del RNAi fue rápidamente documentada en muchos otros organismos (7). Así pues, se considera al RNAi como un sistema que ha revolucionado la biología celular. La revista Science, en su edición de diciembre de 2002, consideró al RNAi como la molécula revelación del año (8), y la revista Nature dedicó en 2004 un número especial al RNAi (9). El hallazgo del RNAi supuso la concesión del premio Nobel de fisiología o medicina a los dos investigadores estadounidenses en el año 2006.

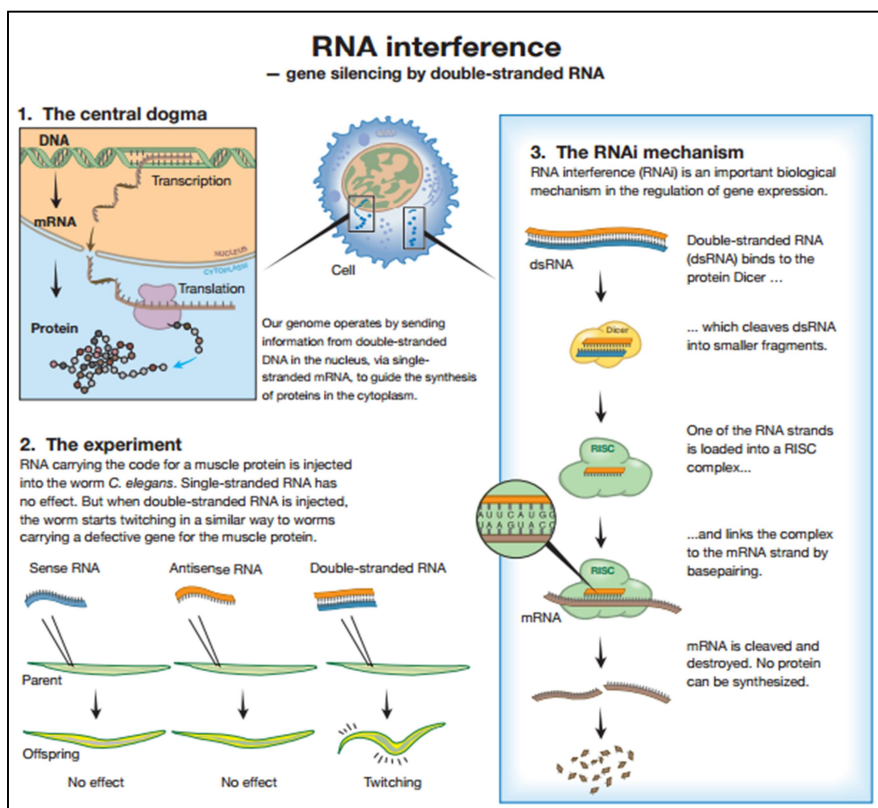


Fig. 1. Esquema en el que la Academia sueca define el descubrimiento del silenciamiento génico por RNAi al anunciar la concesión del premio Nobel a Fire-Mello (@ The Nobel Committee for Physiology or Medicine 2006).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es realizar una revisión acerca del ARN de interferencia, poniendo especial interés en las implicaciones fisiopatológicas de este mecanismo molecular. Con este trabajo también se pretenden abordar las aplicaciones usadas actualmente del ARNi así como en investigación clínica y terapéutica.

METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se llevó a cabo una amplia revisión bibliográfica de distintos artículos científicos sobre ARN interferente. Se empleó para ello las bases de datos bibliográficas Medline (PubMed), SciELO y el buscador Google Académico, restringiendo las búsquedas a los años 2006-2017 y excluyendo aquellos artículos que no estuvieran escritos en inglés o español. Se emplearon los siguientes términos de búsqueda: Interferencia RNA, RNAi aplicaciones, tipos RNAi, RNAi ensayos, RNA interference, RNAi review, RNAi therapy, RNAi therapeutics, RNAi human trial, RNAi cancer, RNAi delivery, RNAi drugs.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

COMPONENTES DEL SISTEMA RNAI

1. TIPOS DE RNAI

Las moléculas de ARN interferentes (o ARNi) son moléculas pequeñas (de 20 a 25 nucleótidos) que se generan por fragmentación de precursores más largos. Se pueden clasificar en tres grandes grupos:

siRNA (small interfering RNA, ARN interferente pequeño): Moléculas de ARN bicatenario de aproximadamente 20 nucleótidos cuyas hebras presentan complementariedad perfecta. Proviene del procesamiento llevado a cabo por un enzima Dicer citoplasmática que corta moléculas exógenas ARN bicatenario largas en varios siRNA. El mecanismo de acción del siRNA comienza cuando la hebra 'antisentido' se ensambla en el complejo proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*), que la utiliza como guía para identificar el ARN mensajero complementario. Seguidamente, RISC cataliza el corte del mRNA en dos mitades que son degradadas por la maquinaria celular, bloqueando la expresión del gen (10). Los siRNA son introducidos de forma exógena en las células. Los últimos hallazgos revelaron también la existencia de una vía de biosíntesis de siRNA endógenos, que se generan a partir de RNA bicatenario que se encuentra como secuencias más largas en forma de horquillas o hairpins (shRNA) en plásmidos o vectores virales. Estos shRNA no requieren procesamiento por Drosha, la enzima nuclear (11).

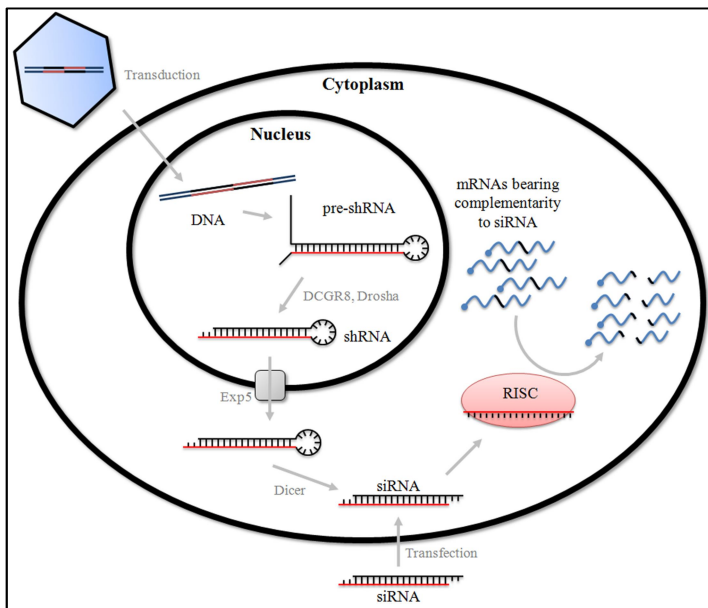
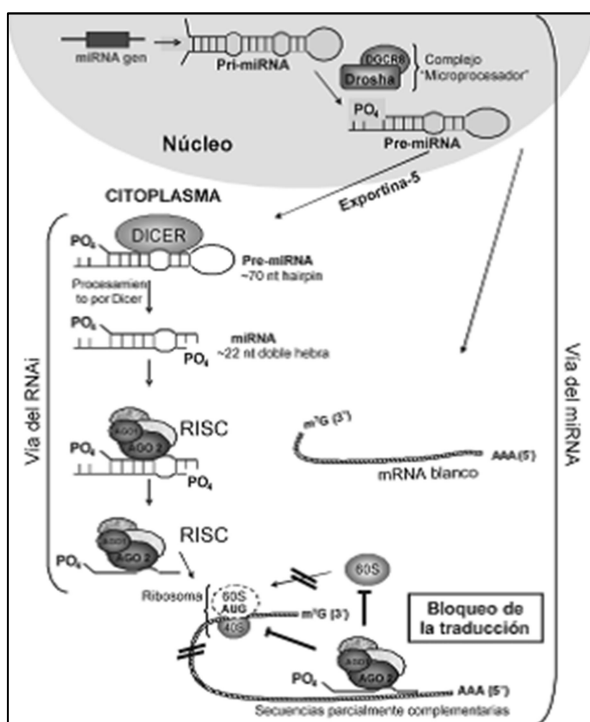


Fig. 2. Mecanismo de acción del ARNi mediado por siRNA y shRNA (O'Keefe E. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. Materials and Methods. 2013;3.)

miRNA (micro-RNA): ARN interferentes pequeños que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas (*hairpins*) con segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre en dos etapas catalizadas por dos enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. El mecanismo de acción es similar al siRNA, la hebra 'antisentido' se incorpora a un complejo similar al RISC y dependiendo del grado de complementariedad con el mRNA, o bien induce su degradación o bien inhibe la traducción. A diferencia de la vía de los siRNA, la degradación de mRNA



mediada por miRNA se inicia con la eliminación enzimática de la cola de poliA (2). En vertebrados, este reconocimiento requiere de una perfecta complementariedad entre el mRNA y la región 5' del miRNA compuesta por 2-7 nucleótidos conocida como "seed" (12, 13).

Fig. 3 Mecanismo de RNAi mediado por miRNAs (Ortiz-Quintero, B. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. Revista de Investigación Clínica. 2009;61(5): 412-427.)

Recientes estudios revelan un origen alternativo de los miRNA. Los mirtrones ('Mirtrons' en inglés) son precursores RNA bicatenarios con estructura de 'hairpin' semejante al precursor de miRNA, pero que provienen de secuencias cortas de intrones que sufren un proceso de 'empalme y corte' o 'splicing'. 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 (14).

piRNA: (Piwi-interacting RNAs, ARN asociados a Piwi): se generan a partir de precursores largos monocatenarios en un proceso independiente de Drosha y Dicer. Estos ARN pequeños se asocian con una subfamilia de las proteínas 'Argonata' (proteínas Piwi). La producción de los piRNAs se inicia a partir de unas pocas regiones maestras de control en el genoma sinténicas (co-localización física de loci en el mismo cromosoma dentro de un individuo o especie). Este grupo de moléculas de la ruta de los RNAi ha sido identificado recientemente, y es por tanto menos conocido, aunque su estudio está introduciendo nuevos puntos de vista para la comprensión de los mecanismos de interferencia por ARN (15, 16).

2. ENZIMA DICER

Participa en el procesamiento de los ARNi en el citoplasma. Es una endorribonucleasa específica de dsRNA que produce cortes escalonados dejando extremos 3'-OH con extendidos de dos a tres nucleótidos. Estos permiten la incorporación al complejo ribonucleoproteico efector, denominado RISC (RNA-induced Silencing Complex). Dicer tiene cuatro dominios: helicasa, unión a dsRNA, motivos RNasa III repetidos en tándem y un dominio de actividad endonucleasa, con proteínas de la familia Argonata (17).

3. RISC

Complejo ribonucleoproteico que hace posible el reconocimiento y degradación del mRNA diana. Primero desenrolla y media la desnaturalización de los siRNA (pérdida de la conformación estructural), permitiendo que la cadena antisentido dirija el complejo hacia el mRNA de secuencia homóloga, mientras que la cadena sentido es degradada. Este reconocimiento ocurre por apareamiento complementario de bases. La actividad endonucleolítica del complejo se debe a que contiene (al igual que Dicer) algunas

proteínas miembros de la familia Argonauta. Una vez cortado, el extremo 3' del mRNA diana es degradado por exorribonucleasas. El destino del mRNA diana no siempre es la degradación. Esto es cierto solo si la hibridación de la cadena antisentido del siRNA con el mRNA es perfecta. En cambio, si existen zonas desapareadas, el complejo queda unido al mRNA diana y aunque no lo corte, obstaculiza el recorrido del ribosoma, deteniendo la traducción. En ambos casos, el efecto es que el gen es silenciado y no se sintetiza la proteína correspondiente (18).

FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL RNAI

Al RNAi se le han ido asignando funciones biológicas con importante repercusión en la regulación de la expresión génica y por tanto, en el desarrollo, evolución y progresión de enfermedades (19). Tomaremos como ejemplo concreto el miRNA miR-122, que se expresa específicamente en el hígado, para contextualizar y hacer referencia a algunas de estas funciones biológicas.

1. INFECCIÓN VIRAL Y LA RESPUESTA INMUNE

Muchos miRNA están regulados en líneas celulares hematopoyéticas y tienen importantes funciones en la regulación del desarrollo, la función de células del sistema inmune, y en las interacciones huésped-patógeno (20). miR-122 se une al ARN genómico del virus de la hepatitis C, provocando un efecto positivo en la traducción y replicación viral. miR-122 es entonces necesario para que el virus se exprese de manera eficiente, y tiene función pro-viral (21, 22).

2. HOMEOSTASIS DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS

Ciertos miRNAs funcionan como reguladores cruciales del colesterol, triglicéridos y homeostasis energética en el organismo. Concretamente, miR-122 juega un papel fundamental en las funciones hepáticas. El secuestro de miR-122 produce una regulación a la baja de la expresión de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y la biosíntesis del colesterol, incluyendo los relacionados con el enzima limitante 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzimaA reductasa (23).

3. CÁNCER

Los miRNA pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes; queda por demostrar su influencia concreta en cada tipo de cáncer (23). Por otro lado, se ha observado que los microRNA contribuyen a la progresión maligna del cáncer, específicamente mediando la invasión tumoral y la formación de metástasis (24). Siguiendo con el ejemplo, la disminución de miR-122 se asocia con mal pronóstico y metástasis en cáncer hepático. Varios genes diana de miR-122 (ciclina G1, ADAM10, IGF1R, SRF y Wnt1) han sido estudiados y se ha demostrado que participan en la hepatocarcinogénesis, la transición epitelio-mesenquimal y la angiogénesis. Los resultados sugieren que miR-122 actúa como supresor de tumores en el hígado (23).

LA TECNOLOGÍA DEL RNAI

La tecnología del RNAi se encuentra en expansión y ofrece aplicaciones prometedoras. La inhibición artificial de la expresión de genes mediante RNAi es conocido como “silenciamiento” o “knocking down”(25). Las ventajas que ofrece se basan en su mayor especificidad, flexibilidad y velocidad. Además, es aplicable a una amplia variedad de organismos, y también permite silenciar al menos dos genes al mismo tiempo. Sin embargo, el uso de RNAi para silenciar un gen particular requiere de ciertas consideraciones a las que nos referiremos a continuación (18).

1. MÉTODO DE SILENCIAMIENTO A UTILIZAR

SIRNA. DISEÑO Y SÍNTESIS DE LA SECUENCIA DEL SIRNA

Los siRNA se pueden obtener por síntesis química. El primer paso es la identificación y selección del mRNA del gen de interés, para diseñar las hebras sentido y antisentido que formarán el siRNA. Para el diseño se utilizan programas informáticos que con algoritmos basados en las características comunes de los siRNA estudiados predicen varias secuencias candidatas. Se escoge el siRNA más eficiente teniendo en cuenta la potencia, estabilidad y especificidad. En este sentido, los parámetros que se pueden optimizar son la longitud, la estructura secundaria, el esqueleto de azúcares-fosfato y la especificidad de secuencia del siRNA.

En cuanto a la longitud, es importante destacar que al introducir RNA largos de doble cadena en células de mamífero se induce una respuesta anti-viral mediada por la

producción de interferón (IFN), la cual produce la inhibición no específica de la traducción y culmina en la apoptosis celular. En cambio, moléculas de siARN de aproximadamente 30 nucleótidos no desencadenan esta respuesta. Además, la estructura secundaria tipo hairpin y la modificación química del esqueleto de azúcares aumentan la estabilidad, y por lo tanto aumentan también la vida media del siRNA dentro de la célula. En general, existe consenso en sugerir que la secuencia de la cadena antisentido del siRNA debería ser complementaria a la región ubicada entre 50 y 100 pares de bases antes del codón de inicio del mRNA diana (18). Por último, se debe probar el grado de silenciamiento para asegurar que éste cumple con las expectativas requeridas.

shRNA. USO DE VECTORES

Para incrementar la duración del silenciamiento por RNAi, se desarrollaron vectores de expresión que contienen promotores de RNA polimerasa para la transcripción de shRNA dentro de propia célula. Existen dos tipos de vectores utilizados:

Plásmidos: Son introducidos a las células mediante transfección o electroporación. No se utilizan in vivo en células de mamíferos.

Vectores de expresión virales: Los vectores de expresión virales son vehículos efectivos para la expresión estable y a largo plazo del shRNA, ya que éste se integra al genoma de la célula diana, y es posible introducirlos prácticamente a cualquier tipo de célula mediante infección. Los vectores de expresión ofrecen la posibilidad de introducir un “marcador” 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.

2. IMPLICACIONES DE LA ADMINISTRACIÓN IN VIVO

Dos estrategias principales para la administración in vivo han sido desarrolladas: el uso de siRNA sintetizados químicamente y el uso de shRNA insertados en vectores virales (shRNA vector viral). Se escoge una u otra en función de la duración del efecto de silenciamiento que se requiera y el tipo de células con el que se desea trabajar (25). Cada una presenta sus ventajas y desventajas: Por un lado, el tratamiento con siRNAs puede ser detenido en cualquier momento al suspender su administración. Sin embargo, el efecto es transitorio (tiempo de silenciamiento medio de 3 a 7 días) y

además resulta difícil diseñar un método efectivo de liberación en la célula o tejido diana. Por otro lado, el shRNA en un vector viral es sintetizado constantemente dentro del organismo infectado, produciendo un silenciamiento prolongado. Cuenta con la ventaja de poder ser liberado efectivamente en la célula o tejido diana al usar vectores provenientes de virus con receptores específicos. 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. En cuanto a la utilización tanto de siRNA como de shRNA *in vivo*, se debe usar la menor concentración posible que produzca el efecto terapéutico deseado para disminuir el riesgo de saturación de los mecanismos endógenos de silenciamiento. La administración además debe ser segura, lo cual incluye el uso de vehículos de liberación no tóxicos (25). Por último, la aplicación del RNAi en la terapéutica requiere forzosamente que los siRNA/shRNAs administrados puedan llegar a la célula o tejido diana para lo cual fueron diseñados.

3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN O 'DELIVERY'

Los vehículos que transportan los siRNA al blanco pretendido son conocidos como sistemas de delivery. Precisamente, el desarrollo de métodos efectivos para la liberación local o sistémica de siRNA/shRNAs en organismos vivo, que protejan a los oligonucleótidos transportados a la vez que sean eficientes y aseguren la correcta llegada a las células diana, sin provocar toxicidad u otros efectos no deseados en el organismo receptor (18), se considera el principal problema a resolver y uno de los mayores retos a los que nos enfrentamos en el uso factible del RNAi en la terapéutica.

siRNA

Los métodos de liberación desarrollados *in vivo* incluyen los siguientes:

Liberación directa en vehículos como solución salina o dextrosa 5%. Relativamente fácil, requiere de bajas concentraciones de siRNA. Muy atractiva como tratamiento local, pero no es útil para tratamiento sistémico. Ha sido utilizado con éxito para liberar siRNA en ojo y pulmón.

Liberación sistémica no específica mediante inyección intravenosa de siRNAs modificados químicamente (más estables) conjugados a colesterol o encapsulados en bicapas lipídicas conocidas ácido nucleico estables, que facilitan la liberación por

endocitosis. Usados con éxito para liberar los siRNA en hígado e intestino delgado, pero no son apropiados para otro tipo de órganos o tejidos.

Liberación sistémica específica dirigida a un órgano o tejido particular. Son siRNAs encapsulados en nanopartículas conjugadas a ligandos o receptores específicos, siRNAs unidos al complejo anticuerpos-protamina y siRNAs fusionados a RNA (25, 26). Nuevos métodos desarrollados consisten en asociar los oligonucleótidos silenciadores a péptidos con cargas positivas que atraviesen las membranas plasmáticas de células de mamífero (cell penetrating peptides o péptidos de penetración celular) (18).

shRNA

Los vectores virales que se utilizan pertenecen a dos familias, retrovirales y lentivirales (VIH-1). Los primeros sólo infectan células dividiéndose activamente por mitosis mientras que los segundos infectan células con y sin actividad mitótica. Un ejemplo de vector lentiviral que ya ha sido usado exitosamente para la liberación de shRNAs en mamíferos es el shRNA-vector lentiviral contra la forma activada del oncogen Ras. Fue usado en ratones para disminuir el crecimiento de células tumorales. 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. 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 (25).

APLICACIONES DEL RNAI. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En teoría, el RNAi podría ser aplicado como tratamiento de cualquier enfermedad asociadas a la expresión o sobre-expresión de un gen conocido. El efecto esperado es detener o disminuir el mecanismo patogénico de la enfermedad, con un buen perfil de seguridad. Así pues, la investigación ha señalado como posibles dianas para terapia los mRNA productos de genes involucrados en el ciclo celular, apoptosis, motilidad

celular, transducción de señales, y estrés oxidativo. A continuación, expondremos varios ejemplos de futuras aplicaciones del RNAi en terapéutica (25).

1. NUEVAS TERAPIAS ANTIVIRALES

Las estrategias en estudio se basan en degradar los RNA de genes virales o del huésped, necesarios para la replicación viral. En el primer caso las dianas elegidas para el silenciamiento son mRNA de polimerasas virales, de reguladores transcripcionales o de otros tipos de factores tempranos de gran importancia en el ciclo viral. En el segundo caso, se actúa sobre productos génicos implicados en codificar para receptores de membrana específicos del virus (18).

Hepatitis B: Las terapias actuales para la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) presentan bajas tasas de curación funcional. Una razón probable es la incapacidad de estas terapias para reducir de forma consistente y sustancial los niveles de producción de antígeno viral HBsAg. Los altos niveles séricos de HBsAg resultan en el agotamiento del sistema inmune del huésped, siendo éste incapaz de presentar la respuesta antiviral efectiva requerida para la eliminación completa del HBsAg. Para reducir la progresión de la enfermedad fuera del tratamiento pueden ser útiles fármacos basados en RNAi, con moléculas que se dirijan específicamente hacia los transcritos virales, incluyendo ARN mensajeros y ARN pregenómicos, y que disminuyan la permanencia del antígeno HBsAg en suero y así desaparezca la necesidad de terapia crónica. El fármaco ARC-520 es un conjugado de RNAi con colesterol cuya diana es un péptido de la membrana de los hepatocitos. Los resultados de los ensayos clínicos de fase 2 indican que ARC-520 fue bien tolerado y resultó en una reducción significativa, dependiente de la dosis, de HBsAg durante 57 días en pacientes con VHB (27).

VIH: La interferencia por ARNi para silenciar la expresión génica específica se está aplicando tanto en factores del huésped (CCR5) como en genes virales implicados en la replicación del VIH-1. Multitud de estudios se están realizando al respecto, la mayoría en modelos animales, aunque ya hay un estudio piloto en humanos (28).

2. CÁNCER

Existe gran interés en utilizar la tecnología del RNAi en el tratamiento de tumores. La evidencia indica que muchos miRNAs están altamente expresados en tejidos

diferenciados, pero su expresión está reducida en tumores (29). Otro ejemplo lo cumplen los protooncogenes, los cuales son genes normales implicados en la regulación del ciclo celular que al ser alterados (por sobreexpresión) se convierten en patológicos. Por ejemplo, podemos mencionar los mRNA que codifican a los inhibidores de apoptosis, la telomerasa, los receptores de factores de crecimiento y algunas moléculas señalizadoras. Por otro lado, también se puede lograr una mejor susceptibilidad de los tumores a fármacos, suprimiendo mediante la tecnología de RNAi los genes encargados de otorgar posibles resistencias, y que codifican un sistema de bombeo que les permite expulsar los compuestos hacia el exterior (genes MDR o multidrug resistance) (18). Algunos ejemplos, aún en estudio, son los siguientes:

Cáncer cervical: muchos estudios se han realizado y se han descrito notables éxitos en la inducción de la muerte de las células cancerosas en cultivo por la administración de siRNA contra los oncogenes E6 y E7 tanto del papilomavirus humano 16 (HPV16) como de 18 (HPV18). Sin embargo, pocos protocolos están respaldados con modelos tumorales animales en los cuales se demuestre la erradicación de los tumores una vez que están establecidos; lo cual representa una condición necesaria de evaluación *in vivo* antes de usar la tecnología de RNAi en estudios clínicos en humanos (30).

Cáncer colorrectal: La expresión de la proteína CDKL1 está aumentada en los tejidos con cáncer cuando se compara con tejidos normales, por lo que CDKL1 es considerado un oncogen. En un estudio realizado en ratones se probó que la supresión de CDKL1 mediante la introducción de CDKL1-shRNA en tejidos cancerosos inhibe la proliferación e invasión celular, impidiendo el ciclo celular de las células cancerosas, y estimula la regulación positiva de p15 y la proteína retinoblastoma. Gracias a este estudio, CDKL1 puede ser considerado una diana para la intervención terapéutica mediante ARNi (31).

Proliferación y resistencia de las células cancerosas: La protein kinasa CK2 se encuentra sobreexpresada en la mayoría de tumores (por ejemplo en próstata). Para conseguir la supresión de CK2 se utiliza una nanocápsula que suministra una carga terapéutica anti-CK2 RNAi específicamente a las células cancerosas. Tenfibgen (TBG) es el ligando que dirige el RNAi hasta el receptor tenascin-C, está elevado en las células cancerosas. Esta estrategia es eficaz para inhibir el crecimiento y para inducir la muerte en varios tipos de tumores de xenoinjerto, no solo en el tumor primario sino también en tumores metastásicos. En estos estudios, se logró una supervivencia de 6 meses en el

huésped a dosis relativamente bajas del agente terapéutico sin ningún efecto adverso aparente en los tejidos normales. Recientemente se ha demostrado el alto nivel de expresión de CK2 en carcinomas de células escamosas y en cáncer de mama de felinos. La supresión de CK2 en estas células produce una inducción de la apoptosis. Con objeto de poder trasladar a humanos estos hallazgos, se han comenzado ensayos de fase I en gatos a los que se administran nanocápsulas de TBG-RNAi-CK2. Los resultados de son prometedores, y proporcionan un fuerte impulso para la realización estudios adicionales y para el diseño de futuros ensayos clínicos en humanos (32).

Glioblastoma: El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una importante diana antitumoral. Un estudio ha demostrado que la administración de CRGD-siEGFR (siARN de EGFR unido a un conjugado cíclico de arginina-glicina-aspartico) puede silenciar la expresión de EGFR en tejido tumoral in vitro e in vivo (modelo animal). Además, la administración intravenosa sistémica de CRGD-siEGFR demostró que la regulación a la baja de EGFR en tumores de ratón (glioblastoma) podía ralentizar sustancialmente el crecimiento tumoral (33).

Cáncer de mama: La sobreexpresión del gen del homólogo 1 del oncogén E26 del virus de la eritroblastosis (ETS1) está correlacionada tanto con la progresión del tumor como con la mala respuesta a la quimioterapia. Un estudio demostró que la expresión génica de ETS1 se encontraba considerablemente reducida después de que el ratón portador de tumor resistente a fármacos se tratara con los nanoconjugados HPAD / siETS1 (siRNA para las dianas ETS1 y doxorubicina). Esto hacía que se mejorara el tiempo de residencia del fármaco en el tejido tumoral. El estudio ofrece por tanto una nueva estrategia de suministro terapéutico dirigido ETS1 para cáncer de mama multirresistente a quimioterapia que podría ser estudiada próximamente en otros modelos animales e incluso en humanos (34).

3. OTRAS APLICACIONES

Daño hepático: Se han desarrollado unas nanopartículas de delivery sensibles al pH para la liberación selectiva de TNF- α siRNA tanto in vivo como in vitro, llamadas PNSDS (pH-sensitive nanoparticles-based siRNA delivery systems). Un estudio demuestra que las PNSDS pueden administrar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) siRNA en macrófagos e inducir el silenciamiento del gen diana en cultivos celulares. Además, las

PNSDS asociada a restos de manosa se acumulan selectivamente en el hígado de ratones, provocando una inhibición específica de la expresión de macrófagos TNF- α in vivo, y protegiendo a los ratones del daño hepático de origen inflamatorio. Los resultados obtenidos hacen pensar que las nanopartículas PNSDS tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda (35).

Tuberculosis: La sobreexpresión de TGF- β (factor de crecimiento transformante β) se relaciona con la reactivación de la tuberculosis, pues contribuye a la supresión de la respuesta inflamatoria de células T y macrófagos. un estudio reciente ha explorado la posibilidad de combinar moléculas de RNAi y medicamentos anti tuberculosos en el mismo sistema de administración para conseguir tratamientos más efectivos. Se trata de administrar liposomas pegilados que encapsulan siRNA para la diana TGF- β junto con cuatro antituberculosos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y estreptomycin). Los liposomas fueron eficientemente absorbido por los macrófagos humanos en cultivo celular. La expresión de TGF- β se inhibió con éxito, y la autofagia de los macrófagos aumentó. Aun así, la respuesta de las células infectadas no fue concluyente, por lo que se espera que nuevos estudios arrojen luz sobre este nuevo posible uso terapéutico del RNAi (36).

CONCLUSIONES

Como hemos visto a lo largo del trabajo, el ARNi tiene potencial para convertirse en una de las terapias del futuro. Es por eso que desde su descubrimiento atrajo la atención de la investigación y la industria farmacéutica, actualmente en pleno proceso de descubrimiento de los mecanismos o factores responsables de enfermedades, posibles dianas para la terapéutica, y herramientas para el desarrollo de la misma. El área clínica, que proporciona la experiencia y conocimientos para el diagnóstico de enfermedades y la capacidad para aplicar tratamientos a seres humanos, es todavía un área poco explorada. Sin embargo, algunos siRNAs y miRNA se encuentran ya en ensayos clínicos, que previsiblemente en pocos años aumentarán, y el uso en humanos de ARNi pasará a ser una realidad, lo que augura un horizonte de esperanza para aplicar esta tecnología como arma terapéutica contra multitud de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*. 1990;2(4):279.
2. Rodriguez M. RNA interferente. 1st ed. España: Real Academia de Farmacia; 2007.
3. Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*. 1992;6(22):3343-3353.
4. Guo S, Kemphues K. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995;81(4):611-620.
5. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-811.
6. Montgomery M, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(26):15502-15507.
7. Tuschl T, Zamore P, Lehmann R, Bartel D, Sharp P. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Development*. 1999;13(24):3191-3197.
8. Couzin J. Breakthrough of the year: Small RNAs Make Big Splash. *Science*. 2002;298(5602):2296-2297.
9. Mello C, Conte D. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004;431(7006):338-342.
10. Rana T. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(1):23-36.
11. Babiarz J, Ruby J, Wang Y, Bartel D, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development*. 2008;22(20):2773-2785.
12. Doench J. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development*. 2004;18(5):504-511.

13. Wang B, Love T, Call M, Doench J, Novina C. Recapitulation of Short RNA-Directed Translational Gene Silencing In Vitro. *Molecular Cell*. 2006;22(4):553-560.
14. Ruby J, Jan C, Bartel D. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-86.
15. Hartig J, Tomari Y, Forstemann K. piRNAs--the ancient hunters of genome invaders. *Genes & Development*. 2007;21(14):1707-1713.
16. Yigit E, Batista P, Bei Y, Pang K, Chen C, Tolia N et al. Analysis of the C. elegans Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi. *Cell*. 2006; 127(4):747-757.
17. Agrawal N, Dasaradhi P, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar R, Mukherjee S. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003;67(4):657-685.
18. Pilloff M, Migliori M, Ghiringhelli P. Serie digital 07 Ciencia y Tecnología. Reseñas en Ingeniería Genética. 1st ed. Universidad Nacional de Quilmes; 2000.
19. Hannon G, Rossi J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*. 2004;431(7006):371-378.
20. Lodish H, Zhou B, Liu G, Chen C. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(3):238-238.
21. Jopling C. Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-1581.
22. Luna J, Scheel T, Danino T, Shaw K, Mele A, Fak J et al. Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR-122. *Cell*. 2015;160(6):1099-1110.
23. Bandiera S, Pfeffer S, Baumert T, Zeisel M. miR-122 – A key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of Hepatology*. 2015;62(2):448-457.
24. Ma L, Weinberg R. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends in Genetics*. 2008;24(9):448-456.
25. Ortiz-Quintero, B. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista de Investigación Clínica*. 2009;61(5): 412-427.
26. Zhou Y, Zhang C, Liang W. Development of RNAi technology for targeted therapy — A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 2014;193:270-281.

27. Gish R, Yuen M, Chan H, Given B, Lai C, Locarnini S et al. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. *Antiviral Research*. 2015;121:97-108.
28. Swamy M, Wu H, Shankar P. Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;103:174-186.
29. Hammond S. RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2006;58(S1):63-68.
30. Peralta-Zaragoza O, Bermudez-Morales, Perez-Plasencia, Salazar-Leon, Gomez-Ceron, Madrid-Marina. Targeted treatments for cervical cancer: a review. *OncoTargets and Therapy*. 2012;315.
31. Qin C, Ren L, Ji M, Lv S, Wei Y, Zhu D et al. CDKL1 promotes tumor proliferation and invasion in colorectal cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2017;Volume 10:1613-1624.
32. Trembley J, Kren B, Abedin M, Vogel R, Cannon C, Unger G et al. CK2 Molecular Targeting—Tumor Cell-Specific Delivery of RNAi in Various Models of Cancer. *Pharmaceuticals*. 2017;10(1):25.
33. He S, Cen B, Liao L, Wang Z, Qin Y, Wu Z et al. A tumor-targeting cRGD-EGFR siRNA conjugate and its anti-tumor effect on glioblastoma in vitro and in vivo. *Drug Delivery*. 2017;24(1):471-481.
34. Wu M, Liu X, Jin W, Li Y, Li Y, Hu Q et al. Targeting ETS1 with RNAi-based supramolecular nanoassemblies for multidrug-resistant breast cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2017;253:110-121.
35. Tang Y, Zeng Z, He X, Wang T, Ning X, Feng X. SiRNA Crosslinked Nanoparticles for the Treatment of Inflammation-induced Liver Injury. *Advanced Science*. 2016;4(2):1600228.
36. Man D, Chow M, Casettari L, Gonzalez-Juarrero M, Lam J. Potential and development of inhaled RNAi therapeutics for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;102:21-32.