



Implicaciones fisiopatológicas de los RNA de interferencia

Carmen Barrón García – Facultad de Farmacia - UCM



Descarga el trabajo completo

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

¿Qué es la interferencia por ARN o ARNi?

Es un proceso de silenciamiento génico post transcripcional mediado por moléculas de ARN característico de células eucariotas.



Grupo investigación de Rich Jorgensen, 1990.

- Intentaron aumentar el color púrpura de unas petunias introduciendo en la planta una copia extra del gen que codifica para el enzima que participa en la producción del pigmento.
- 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**.

Universidad de Roma

- Al introducir copias adicionales del gen que codifica para el pigmento naranja de *Neurospora crassa*, los hongos resultantes presentaban tonos blanquecinos.
- A este fenómeno lo llamaron **'quelling' o supresión**.

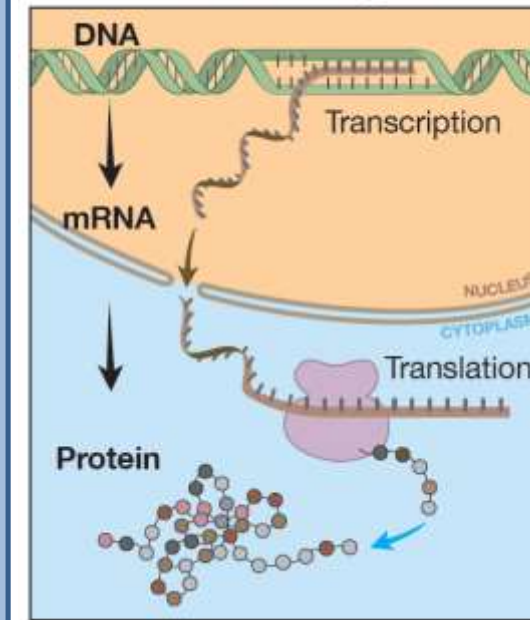
Universidad de Cornell, 1995.

- El estudiante Sue Guo 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.

EL DESCUBRIMIENTO DEL ARNi

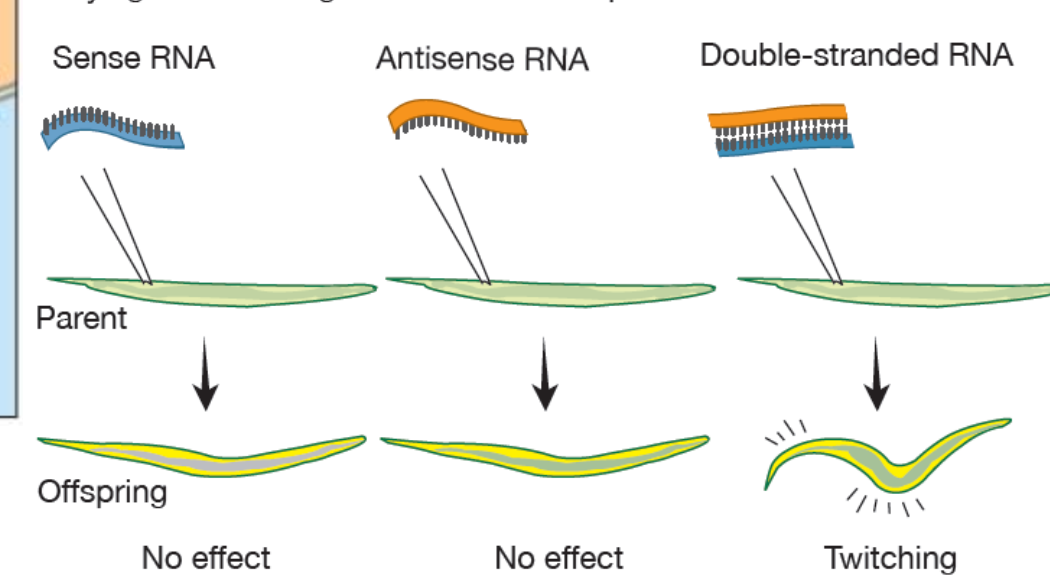
En 1998 se publicó en la revista Nature el artículo de Andrew Z. Fire y Craig C. Mello «**Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C. elegans***» presentando el mecanismo de silenciamiento génico por RNAi. Este hallazgo supuso la concesión del premio Nobel de fisiología o medicina a los dos investigadores estadounidenses en el año 2006.

1. The central dogma



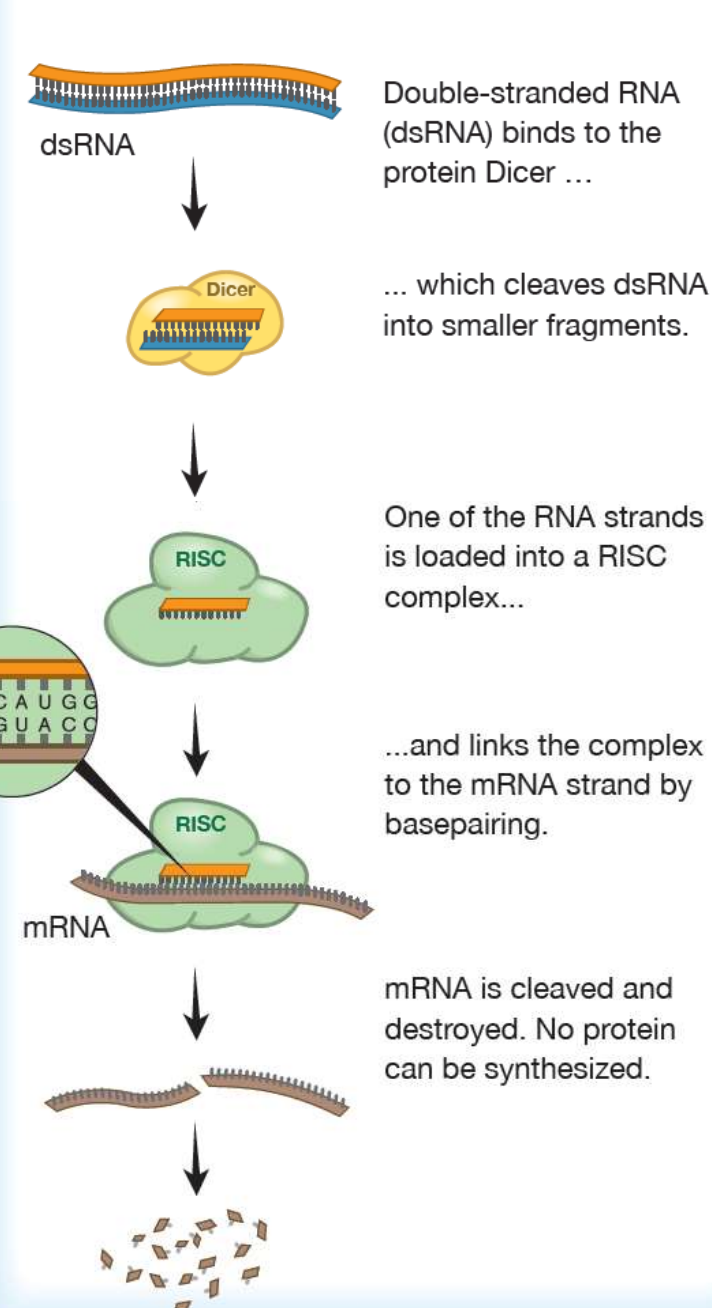
2. The experiment

RNA carrying the code for a muscle protein is injected into the worm *C. elegans*. Single-stranded RNA has no effect. But when double-stranded RNA is injected, the worm starts twitching in a similar way to worms carrying a defective gene for the muscle protein.



3. The RNAi mechanism

RNA interference (RNAi) is an important biological mechanism in the regulation of gene expression.



OBJETIVOS

- ❖ El objetivo principal es realizar una revisión acerca del ARN de interferencia, poniendo especial interés en las implicaciones fisiopatológicas de este mecanismo molecular.
- ❖ También se pretenden abordar las actuales y futuras aplicaciones del ARNi en investigación clínica y terapéutica.

METODOLOGÍA

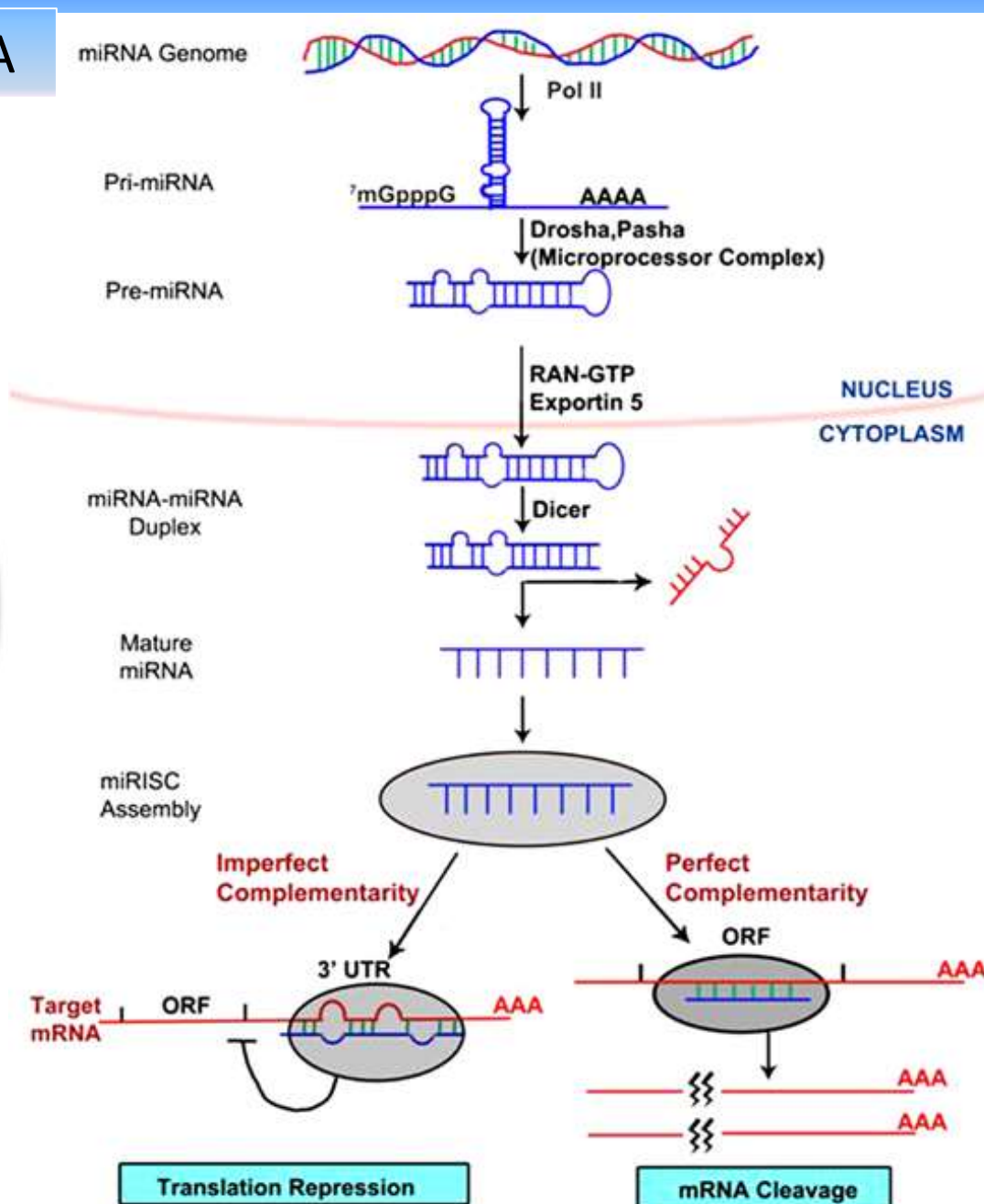
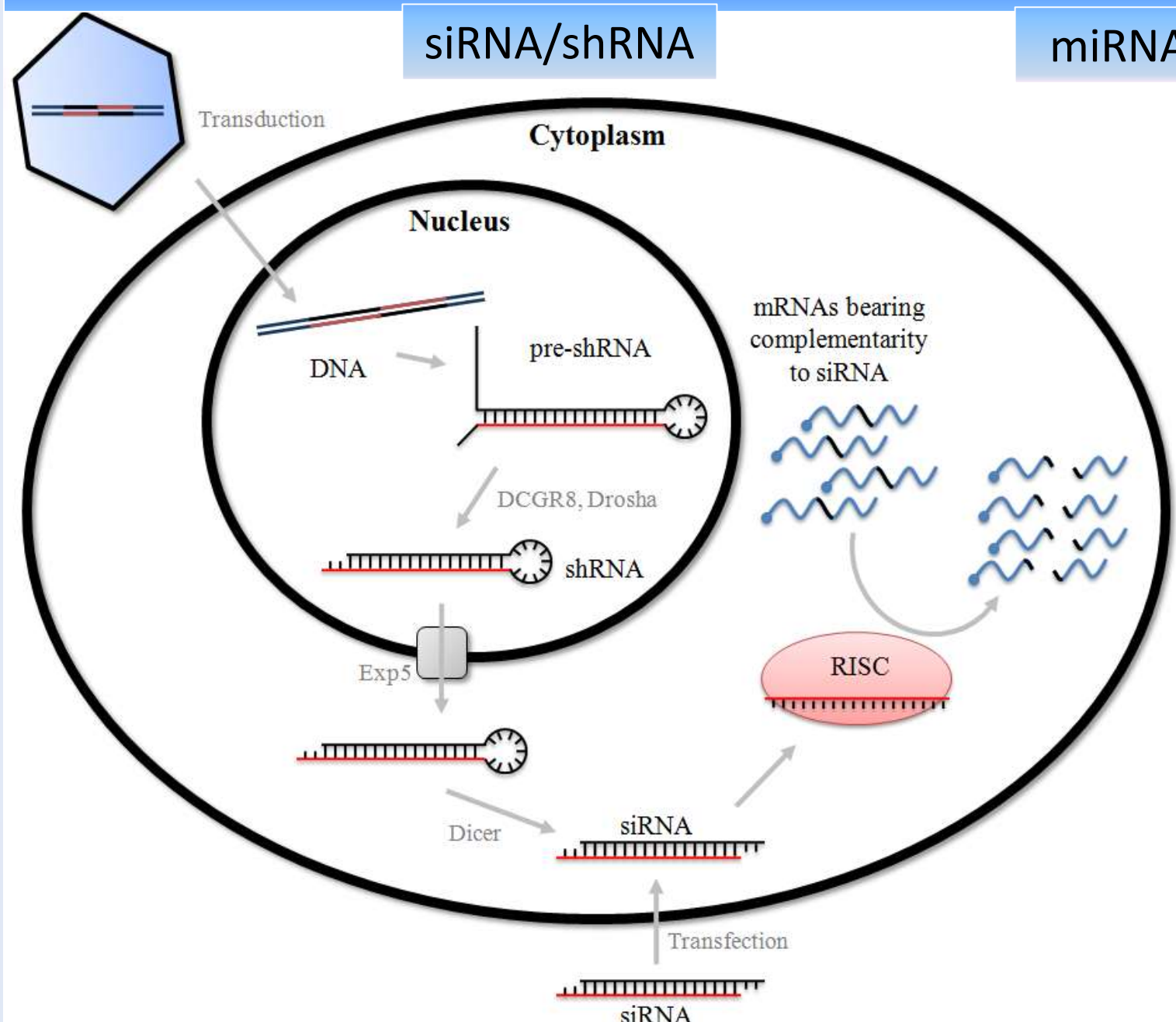
Se llevó a cabo una amplia revisión bibliográfica de distintos artículos científicos empleando las bases de datos Medline (PubMed), SciELO y el buscador Google Académico, restringiendo las búsquedas a los años 2006-2017 y excluyendo aquellos artículos que no estuvieran escritos en inglés o español. Términos de búsqueda: RNA interference, RNAi review, RNAi therapy, RNAi therapeutics, RNAi human trial, RNAi cancer, RNAi delivery, RNAi drugs.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TIPOS DE RNAi

siRNA/shRNA

miRNA



LA TECNOLOGÍA DEL RNAi

Las ventajas que ofrece el silenciamiento génico por RNAi son mayor especificidad, flexibilidad y velocidad, que es aplicable a una amplia variedad de organismos, y que permite silenciar varios genes al mismo tiempo.

Método	siRNA	shRNA
Características	• Síntesis química • Moléculas de aproximadamente 30 nucleótidos (no desencadenan respuesta antiviral mediada por IFN) • Estructura secundaria tipo hairpin y azúcares modificados para ↑ estabilidad • Cadena antisentido complementaria a la región entre 50-100 pares de bases antes del codón de inicio del mRNA diana	• Uso de vectores para ↑ duración del silenciamiento • Los vectores virales posibilitan el introducir un marcador que permita verificar que el shRNA haya sido introducido a la célula de interés y para purificar las células transfectadas o infectadas
Ventajas	• El tratamiento puede ser detenido en cualquier momento • Difícil diseñar un método efectivo de liberación en la célula o tejido diana	• Silenciamiento prolongado • Puede ser liberado de manera efectiva en la célula o tejido diana al usar vectores provenientes de virus con receptores específicos
Inconvenientes	• Efecto transitorio (3-7 días)	• El tratamiento no puede ser detenido

APLICACIONES DEL RNAi. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Se puede lograr una mejor respuesta a fármacos suprimiendo los genes que otorgan resistencias codificando para un sistema de bombeo que los expulsa al exterior (genes MDR o multidrug resistance). Otra estrategia es suprimir protooncogenes que se encuentran sobreexpresados en la enfermedad.

- **Cáncer colorrectal:** La expresión de la proteína CDKL1 está aumentada en los tejidos cancerosos. Un estudio realizado en ratones probó que su supresión mediante la introducción de CDKL1-shRNA inhibe la proliferación e invasión celular, y estimula la regulación positiva de la proteína retinoblastoma.
- **Cáncer de mama:** La sobreexpresión del gen ETS1 se asocia con la progresión del tumor y la mala respuesta a la quimioterapia. Un estudio demostró que su expresión se reduce al tratar un tumor resistente a fármacos con los nanoconjugados HPAD / siETS1 (siRNA para las dianas ETS1 y doxorubicina), mejorando el tiempo de residencia del fármaco

Las estrategias son degradar los mRNA de polimerasas virales, de reguladores transcripcionales o de otros factores tempranos de gran importancia en el ciclo viral, o silenciar genes del huésped necesarios para la replicación viral como los que codifican para receptores de membrana específicos del virus.

- **Hepatitis B:** El fármaco ARC-520 es un conjugado de RNAi con colesterol frente a HBsAg cuya diana es un péptido de la membrana de los hepatocitos. Los resultados de los ensayos clínicos de fase 2 indican una reducción significativa del HBsAg en suero durante 57 días.

FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL ARNi

La regulación de la expresión de genes específicos tiene gran importancia en procesos de desarrollo y diferenciación celular, defensa frente a virus, y en la evolución y progresión de enfermedades. Un ejemplo es el miRNA específico del hígado miR-122:

Infección viral y 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.
- 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.

Homeostasis del colesterol y triglicéridos

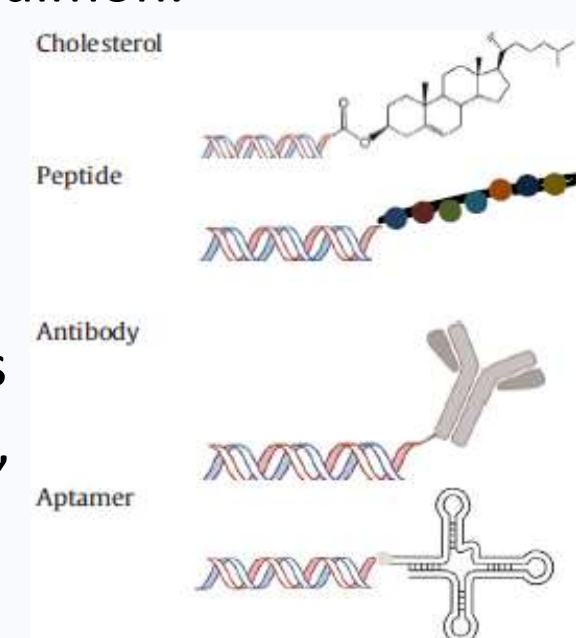
- Ciertos miRNAs funcionan como reguladores cruciales del colesterol, triglicéridos y homeostasis energética en el organismo.
- miR-122 juega un papel fundamental, ya que su secuestro produce una regulación a la baja de la expresión de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y la biosíntesis del colesterol.

Cáncer

- Los miRNA pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes; queda por demostrar su influencia concreta en cada tipo de cáncer. Por otro lado, se ha observado que algunos microRNA contribuyen a la progresión maligna del cáncer, mediando la invasión tumoral y la formación de metástasis.
- La disminución de miR-122 se asocia con mal pronóstico y metástasis en cáncer hepático. Se ha demostrado que varios genes diana estudiados de miR-122 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.

SISTEMAS DE LIBERACIÓN O DELIVERY

- **Directa:** en solución salina o dextrosa al 5%. Fácil, requiere de bajas concentraciones. Útil para tratamiento local en ojo y pulmón.
- **Sistémica inespecífica:** inyección iv de siRNAs conjugados a colesterol o encapsulados en bicapas lipídicas. Éxito en hígado e intestino delgado.
- **Sistémica específica:** encapsulados en nanopartículas conjugadas a ligandos o receptores específicos, unidos al complejo anticuerpos-protamina, fusionados a RNA, o asociados a péptidos con cargas positivas que atraviesan membranas.



- **Vectores lentivirales (VIH-1).** shRNA-vector lentiviral contra la forma activada del oncogen Ras usado exitosamente para disminuir el crecimiento de células tumorales en mamíferos.
- **Vectores adenovirales:** shRNA dirigido contra el gen huntingtin (causante de la enfermedad de Huntington) unido al vector fue usado con éxito en modelos murinos valiéndose de la atracción natural del adenovirus hacia las neuronas.

CONCLUSIÓN

El ARNi tiene potencial para convertirse en una de las terapias del futuro. Actualmente la investigación y la industria farmacéutica se centran en el descubrimiento de los mecanismos responsables de enfermedades, posibles dianas para la terapéutica, y herramientas para el desarrollo de la misma. El área clínica es todavía un área poco explorada. Sin embargo, algunos siRNAs y miRNA se encuentran ya en ensayos clínicos, y en pocos años su uso en humanos pasará a ser una realidad, lo que augura un horizonte de esperanza para aplicar esta tecnología como arma terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Rodríguez M. RNA interferente. 1st ed. España: Real Academia de Farmacia; 2007.
- Ortiz-Quintero, B. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. Revista de Investigación Clínica. 2009;61(5): 412-427.

(Bibliografía completa en el trabajo descargable)