

RNA DE INTERFERENCIA: BLOQUEANDO LA LIBERTAD DE EXPRESIÓN

Dulce María Delgadillo

Dulce María Delgadillo es licenciada en biología por la UNAM, maestra en ciencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) del IPN y doctora en ciencias por el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (Cicata) del IPN.

Hacia fines de la década de 1960 la manipulación del material genético de diversos organismos sentó las bases de lo que se denominó ingeniería genética. Como una especie de corte y confección molecular, secuencias de DNA provenientes de organismos totalmente diferentes (por ejemplo virus y bacterias) pudieron ser unidas en una sola molécula. Con el proceso de corte y unión de secuencias nucleotídicas nació lo que se llamó clonación molecular, y al producto obtenido de la combinación de dos secuencias genómicas diferentes se le asignó el mítico nombre de quimera.

En 1970 se encontró que los retrovirus (virus con un genoma constituido por ácido ribonucleico o RNA) eran capaces de incluir en su genoma secuencias génicas ajenas, quizá tomadas del material genético de la última célula que infectaron, para luego transportarlas a manera de vector al interior de una nueva célula receptora e integrarlas en el genoma de ésta. Muchas de las secuencias integradas fueron tomadas como propias por la célula y así se expresaron como proteínas funcionales. Esto dio la pauta para que los científicos propusieran que algunas enfermedades genéticas podrían ser tratadas mediante la sustitución o reparación del DNA deficiente y, en el caso de las infecciones, destruir los genes vita-

les de los agentes patógenos. Este procedimiento dio origen a la terapia génica.

En 1989 se inició "formalmente" la aplicación de la terapia génica como una estrategia novedosa en el tratamiento de varios tipos de cáncer y algunas enfermedades de origen genético. Sin embargo, luego de más de diez años de aplicación e investigación, la terapia génica no ha dejado de ser un proceso experimental. El desaliento en el terreno de la clínica se presentó cuando los pacientes mostraron complicaciones posteriores al tratamiento. Al parecer, esto fue consecuencia, en muchos casos, de la expresión no sólo de los genes insertados sino de los genomas virales usados como vectores. También, la inserción errónea de las secuencias génicas en sitios de control del genoma del paciente han provocado alteraciones a nivel molecular cuyas consecuencias fisiológicas siempre han sido fatales.

Los obstáculos encontrados en la aplicación de la terapia génica han alentado a los investigadores a buscar otras formas de tratamientos clínicos y, en general, la ciencia biomédica ha seguido explorando nuevas estrategias de manipulación genética. En los años recientes, los estudios científicos se han enfocado más que a sustituir a algún gen dañado, a tratar de inhibir su expresión. Esto quiere decir, en última instancia, evitar que se lleve a cabo la síntesis de la proteína para la que ese gen dañado codifica. Se dice que en la naturaleza las cosas existen y sólo hace falta descubrirlas, lo cual es cierto especialmente en biología molecular, como veremos en el tema aquí tratado, del que poco o nada se sabía y no obstante se ha aprendido mucho en la nueva era genómica.

Tras un arduo proceso de investigación se ha encontrado que en las células eucarióticas que son infectadas con algunos virus existe un mecanismo de regulación génica que controla la presencia de las moléculas de RNA virales potencialmente expresables. Dicho mecanismo se encontró en plantas y hongos y constituyó un descubrimiento sorprendente ya que significaba un nuevo mecanismo de inmunidad antiviral. Además de las plantas y los hongos, algunos componentes de este curioso sistema han sido encontrados en células de animales invertebrados como gusanos planos, protozoarios como el ciliado *Paramecium*, la amiba *Dictyostelium discoideum* y en algunos tripanosomas. Se sabe que este tipo de organismos no poseen la maquinaria necesaria para montar una respuesta inmune mediada por interferón y que es

característica en infecciones virales en vertebrados. Quizá por esta razón los patógenos virales que infectan a los organismos invertebrados tienen la capacidad de duplicar su genoma en las células infectadas de manera relativamente fácil. Entonces, la pregunta obligada es ¿cómo responden los invertebrados a este tipo de infecciones? La respuesta está dada por el mismo mecanismo molecular empleado por las plantas y los hongos: el sistema de RNA de interferencia (RNAi). Este mecanismo es inducido por una molécula de RNA de doble cadena, tal vez generada por los intermediarios replicativos de los virus infectantes.

Sabemos que los vertebrados sí son capaces de responder inmunológicamente ante infecciones virales utilizando varias estrategias celulares entre las que se incluye la producción de interferón. Esta molécula reduce la dispersión de los virus pues inhibe la expresión de los genes virales e induce la muerte de las células infectadas. Sin embargo, al parecer, las células de todos los organismos vertebrados también responden a la presencia del RNA de doble cadena proveniente de los virus que las infectan. Luego de la entrada de los virus, el organismo activa una respuesta inmune dirigida contra las proteínas virales. Pero, además, la duplicación del material genómico de los virus induce una señal de alarma en el interior de las células infectadas. Entonces, ¿es posible que los mecanismos intracelulares de control sobre moléculas de RNA foráneo puedan representar un sistema molecular de defensa subcelular? Al parecer esto sí es posible aunque, como ya se mencionó, este proceso se ha descubierto hasta el momento y de manera contundente en sistemas biológicos carentes de una respuesta de defensa inmunológica orquestada por un mecanismo celular complejo.

Pero si hemos hablado de un sistema de defensa inmune o del control de la expresión génica en el que el principal protagonista es una molécula de RNA de doble cadena, cabe preguntarnos ¿de dónde proviene este RNA? El RNA normalmente está conformado por una sola cadena de bases nucleotídicas o ribonucleótidos, sin embargo, en virus cuyo genoma está constituido por RNA, durante el proceso de duplicación del material genético se generan moléculas de RNA de doble cadena que son factores clave para que haya un copiado del genoma viral preciso y eficiente. Pero ¿qué efecto tiene este tipo de moléculas foráneas en la célula infectada? ¿Es esta célula capaz de identificarlas como propias? Y si esto no es así ¿cuál es el destino de las cadenas dobles de RNA?



Con base en los resultados obtenidos de las investigaciones realizadas en invertebrados, se ha propuesto que la función natural del silenciamiento de RNA en estos organismos es un mecanismo de defensa innato contra infecciones virales. También se sabe que el control de la expresión génica a través del RNA de interferencia puede ocurrir a nivel de la transcripción o síntesis del RNA mensajero (RNAm), o bien a nivel postranscripcional. Recordemos que las secuencias de nucleótidos que conforman las moléculas de RNAm son las que posteriormente serán descodificadas y traducidas a proteínas. Al control de la expresión que se realiza después de la transcripción de los genes se le llama silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, postranscriptional gen silencing), y sólo se ha detectado en algunas plantas y hongos.

Ahora bien, ¿qué particularidades tiene el RNA de interferencia que lo hacen clave en el reconocimiento de los RNAs virales o extraños a la célula? La característica principal del RNAi es su alta especificidad de secuencia. Esto significa que cada molécula de RNA interferente es homóloga o muy parecida a la secuencia del RNA mensajero blanco que bloqueará. Aquí cabe preguntarnos: ¿cómo trabaja el RNA de interferencia? Este interesante mecanismo de control génico se lleva a cabo en diferentes fases con la participación de distintas moléculas. Uno de los componentes esenciales es

una enzima denominada Dicer, que pertenece a una familia de nucleasas conocida como RNasa III. Se sabe que estas proteínas están conservadas evolutivamente en gusanos, moscas, plantas, hongos y mamíferos, lo que podría indicar su participación en procesos biológicos semejantes. Los miembros proteicos de la familia RNasa III se caracterizan por reconocer y cortar específicamente cadenas dobles de RNA.

En su estructura molecular la enzima Dicer presenta una secuencia de aminoácidos que le confieren la función de desenrollar las cadenas dobles de RNA. Esta actividad de helicasa requiere de la energía liberada por el rompimiento o hidrólisis de una molécula de trifosfato de adenosina o ATP. Por otra parte, la proteína Dicer corta uniformemente al RNA de doble cadena en fragmentos pequeños de 22 nucleótidos conocidos como RNAs guías o RNAs pequeños de interferencia (siRNA, small interference RNA). Estos siRNA son los que por su alta homología con la secuencia del RNAm blanco bloquearán la expresión del gen.

Luego de que las moléculas de siRNA se han producido, son incorporadas de manera selectiva a un complejo de proteínas llamado RISC (RNA induced silencing complex), cuya formación es inducida por la presencia del mismo RNA de doble cadena. Cuando un siRNA se incorpora al RISC, lo hace a través de la unión con una proteína de la familia Argonauta junto a otros factores proteicos aún no identificados. Una vez que un siRNA específico se ha incorporado al RISC, el conjunto proteico completo captura a una molécula de RNAm blanco cuya longitud es de 200 a 500 bases nucleotídicas. Capturada la molécula blanco, una ribonucleasa aún no identificada y que forma parte del RISC, corta al RNAm en el centro de su secuencia complementaria al RNA guía, precisamente en el espacio que abarca la doble cadena de RNA. Finalizada esta reacción, todo el complejo multiproteico se desprende de los RNAs quedando listo para buscar una nueva molécula blanco, mientras el RNAm cortado es degradado por las exonucleasas celulares, que son las moléculas encargadas de destruir las cadenas de ácidos nucleicos incompletas o fragmentadas.

Algunos conocimientos sobre la función de las proteínas también pueden desprenderse del estudio de su estructura y su secuencia. En el caso de la proteína Dicer se sabe que presenta secuencias de aminoácidos relacionadas con procesos biológicos tales como la determinación del destino de células madre o troncales (aquellas con el potencial para di-

ferenciarse en cualquier célula especializada). Esto ha llevado a los investigadores a pensar que el RNA de interferencia además de ser un sistema de defensa en respuesta a RNAs desconocidos, quizá sea parte integral de un mecanismo endógeno de regulación génica. Esto significa que el RNAi puede ser una estrategia celular para concertar el encendido y apagado de genes durante el desarrollo embrionario o a lo largo de la vida de un organismo.

El interés creciente por el mecanismo de RNA de interferencia está vinculado con la identificación de un gen de ratón que codifica para una proteína similar a la enzima Dicer con los dominios de helicasa, los dominios catalíticos de las RNAsas III y los motivos de unión a moléculas de RNA de doble cadena. Esto quiere decir que, como se sospechaba, el bloqueo de la expresión génica a través del RNA de interferencia también se lleva a cabo en mamíferos. De hecho, recientemente se ha identificado una proteína tipo Dicer en células de humano.

Los estudios sobre RNA de interferencia en centros de investigación como la Universidad de Cambridge, en Inglaterra, y el instituto Max Planck, en Alemania, se han encaminado a utilizar al RNAi para silenciar genes en embriones de ratones o en células renales de embrión humano. Esto se ha realizado con el objeto de dilucidar mecanismos que regulan la expresión de genes específicos durante el desarrollo embrionario. Los estudios acerca de la aplicación del RNAi en humanos están encaminados hacia el tratamiento, en teoría, de cualquier enfermedad que guarde relación con el funcionamiento anormal de uno o varios genes. Sin embargo, hay que considerar que las funciones celulares anómalas manifestadas en pacientes con una enfermedad de origen genético representan problemas fisiológicos complejos en los que participan múltiples factores. Esto debe tenerse en cuenta en el momento de intentar restaurar la actividad de un solo gen o de un grupo reducido de éstos.

En investigaciones realizadas en la Universidad de Stanford, en el Instituto Beckman de California y en la Universidad de Massachussets, se han aportado evidencias que muestran la inhibición de la propagación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mediante la interferencia de la síntesis de proteínas importantes para la replicación del virus. Asimismo, se han obtenido resultados favorables en experimentos de RNAi en los que se bloquea la expresión de algunos genes virales que participan en enfermedades como la

hepatitis B, algunas patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Machado-Jacobson y la esclerosis lateral amiotrófica, así como en ciertos tipos de cáncer asociados a infecciones virales, como en el caso del cáncer cervicouterino causado por el virus del papiloma (HPV).

Los estudios sobre el RNAi han alcanzado grandes dimensiones debido a su potencial tanto en la clínica como en la investigación biológica a nivel experimental. En el último año al menos dos grupos de investigación, uno en la Escuela de Medicina de Harvard y otro en el Instituto de Cancerología de Holanda, han desarrollado bancos o genotecas de RNA de doble cadena dirigidos contra genes tanto de ratón como de humano. Estos bancos son vastos conjuntos de secuencias sintéticas cortas de RNA que pueden ser usadas para bloquear o inhibir la expresión de genes individuales específicamente seleccionados, para así determinar la función que llevan a cabo dentro de la célula. Para darnos una idea, actualmente la genómica funcional puede trabajar con miles de genes para establecer conjuntos o subconjuntos de éstos relacionándolos en rutas o mecanismos moleculares específicos en el contexto celular, de manera que un solo banco puede contener secuencias dirigidas contra más de nueve mil genes de humano o más de cinco mil genes de ratón. Sin embargo, todavía queda por averiguar e implementar las técnicas que permitan, de la mejor manera posible, introducir las moléculas de RNA interferente en los pacientes, dirigirlos hasta las células dañadas o infectadas y hacer que actúen exclusivamente en el RNA mensajero blanco.

Con base en éstos y muchos estudios más realizados hasta el momento, se puede ver que los grupos de secuencias sintéticas de siRNA son una poderosa herramienta para la investigación biomédica, pero su uso terapéutico requiere aún de numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. No obstante, las evidencias experimentales apoyan la hipótesis de que el RNA de interferencia existe como un mecanismo de defensa natural contra patógenos virales en células de mamífero, plantas, hongos y protozoarios. Su descubrimiento ha significado aprender de la naturaleza la manera en la que sus diferentes elementos actúan en pro del mantenimiento de un equilibrio homeostático en los organismos. La dilucidación molecular, bioquímica y fisiológica de un proceso biológico natural como el RNA de interferencia, permitirá emplear el conocimiento adquirido en el desarrollo de nuevas terapias médicas. •