

# Interferencia por ARN:

## un sistema de defensa primitivo



El mecanismo de interferencia que destruye los ARN mensajeros de genes específicos, no sólo actúa como un sistema molecular de defensa contra virus, sino que podría llegar a tener aplicaciones terapéuticas.

**Miguel Ángel Déctor y Carlos F. Arias**

**E**s sorprendente descubrir que la mayoría, si no es que todos los eucariontes (organismos cuyas células tienen un núcleo definido por una membrana), contamos con un mecanismo que protege la información genética desde el interior de cada célula, y que en plantas, y quizá también en animales, defiende a las células de las infecciones virales. Este mecanismo se perfila como una herramienta biológica sumamente poderosa para estudiar la función de los genes.

El proceso al que nos referimos es conocido como “interferencia por ácido ribonucleico (ARN)”, proceso por el cual se inhibe de manera específica la expresión de un gen, a través de la degradación del ARN mensajero de ese gen, evitando así la síntesis de la proteína. (Hay que recordar que la información genética, contenida en el ácido desoxirribonucleico, o ADN, se transcribe en forma de un ARN mensajero para dirigir la fabricación de proteínas). Dado que el flujo de información genética se interrumpe a nivel de la síntesis de proteína, sin alterar el paso de ADN a ARN (transcripción) en el núcleo celular, se dice que este mecanismo de silenciamiento génico ocurre a nivel post-

transcripcional. Esta respuesta biológica a ARN de doble cadena, media la resistencia a ácidos nucleicos “extraños” a la célula, tanto endógenos (por ejemplo transposones, fragmentos de ADN que pueden transferirse de un lugar a otro del genoma) como exógenos (por ejemplo virus o transgenes, ver adelante), y regula la expresión de algunos genes celulares, particularmente durante el desarrollo y diferenciación de los tejidos de un organismo.

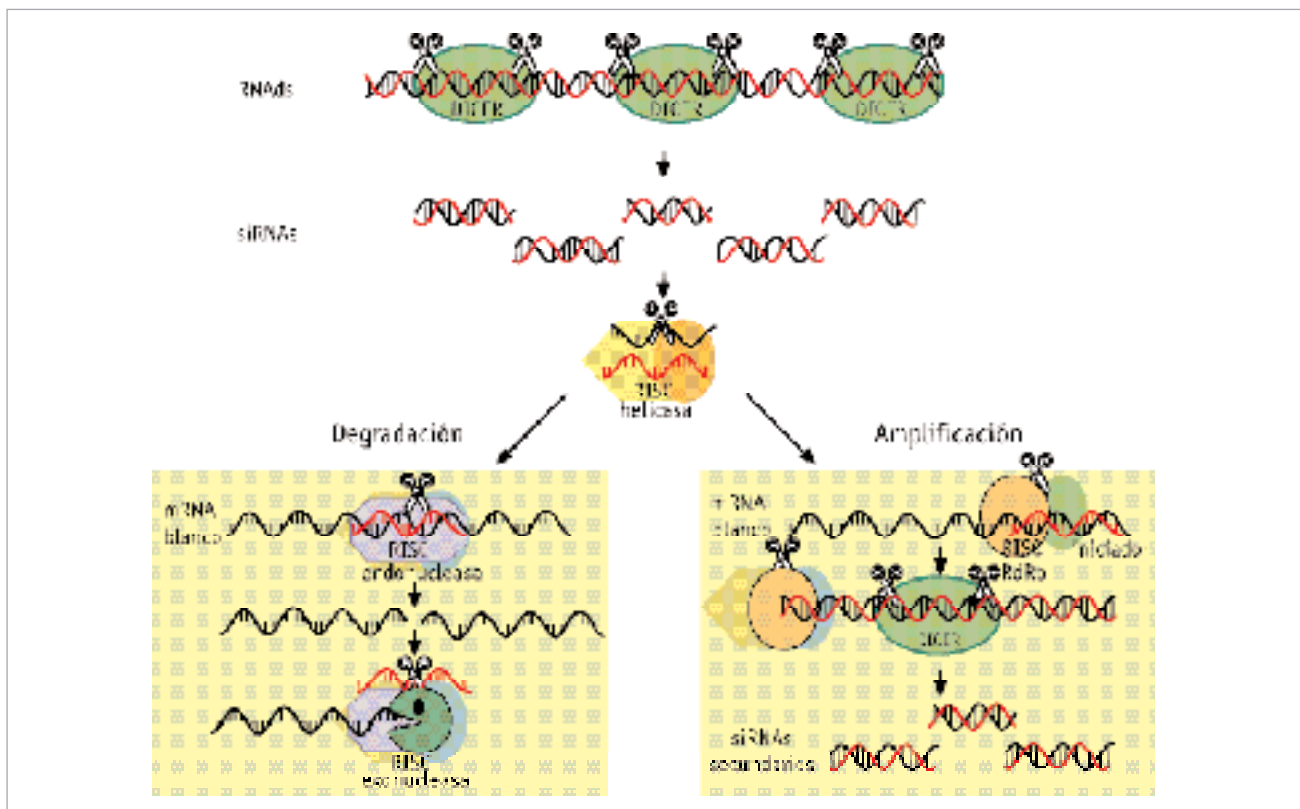
El fenómeno de interferencia por ARN, descubierto en 1998 en el gusano *Caenorhabditis elegans*, está relacionado mecánicamente a los fenómenos de silenciamiento génico reportados inicialmente en plantas en 1990, conocidos como “co-supresión”, “silenciamiento génico postranscripcional” o “silenciamiento postranscripcional inducido por virus”, así como al fenómeno de “*quelling*” (supresión) descrito en hongos. El que este mecanismo se

encuentre en diversos organismos eucariontes, desde protistas y hongos, hasta plantas, invertebrados y mamíferos, indica que es un mecanismo ancestral conservado evolutivamente, el cual estaba ya presente en los organismos unicelulares que los precedieron hace aproximadamente mil 500 millones de años.

**EL ARN DE DOBLE CADENA ES EL ARN INTERFERENTE**

La interferencia por ARN es un proceso inducido por la presencia de ARN de doble cadena.

La maquinaria de interferencia por ARN usa la información presente en la secuencia del ARN de doble cadena como guía para degradar el ARN mensajero que comparta esa secuencia (figura 1). De esta manera, la interferencia por ARN es altamente específica, ya que sólo afecta la expresión de los genes que tengan una secuencia idéntica al ARN de doble cadena que inició el proceso. La presencia de moléculas de ARN de doble cadena es percibida por la célula como un evento anormal, ya que usualmente no hay en las células este tipo de ARN. Aunque las tres clases de ARN celulares más abundantes (ARN ribosomal, ARN de transferencia y ARN mensajero) forman estructuras secundarias en las que existen regiones de doble cadena, estas regiones son ignoradas por la maquinaria de silenciamiento celular. En



**Figura 1.** Modelo general de la interferencia por ARN en organismos eucariontes. El “gatillo” principal que dispara la interferencia por ARN es el ARN de doble cadena, el cual es reconocido y segmentado a ARN interferentes pequeños por la ARNasa Dicer. Los ARN interferentes pequeños se incorporan al complejo silenciador y se separan sus dos hebras por medio de una actividad de helicasa. El complejo silenciador reconoce al ARN mensajero blanco y pueden suceder dos eventos. En el primero, el complejo silenciador reconoce al ARN mensajero tomando como guía a la cadena negativa del ARN interferentes pequeños (en rojo) y el ARN mensajero se corta por la mitad de la doble cadena de ARN interferentes pequeño-ARN mensajero. El ARN cortado es degradado completamente por una actividad de exonucleasa. En el segundo caso la hebra antisentido (en rojo) puede servir como iniciador para la síntesis de la cadena complementaria por una ARN-polimerasa dependiente de ARN, lo que genera un nuevo ARN de doble cadena, el que se convierte en ARN interferentes pequeños secundarios. Los ARN interferentes pequeños secundarios entran nuevamente en la ruta interferencia por ARN amplificando la señal interferente. En ambos casos se inactiva el ARN mensajero evitando su traducción. Se señalan las actividades enzimáticas del complejo silenciador RISC en cada paso.

todos los organismos donde se ha descrito la interferencia por ARN, el ARN de doble cadena representa la única llave de acceso hacia la respuesta interferente.

### ¿CÓMO FUNCIONA LA INTERFERENCIA POR ARN?

El proceso de interferencia por ARN se inicia cuando una ribonucleasa (ARNasa; enzima que degrada ARN) de tipo III, llamada “Dicer”, convierte al ARN de doble cadena en fragmentos de 21 a 26 pares de bases con dos nucleótidos sobresalientes en cada uno de los extremos 3’ (figura 1), los cuales se conocen como ARN interferentes pequeños. Los ARN interferentes pequeños así generados son incorporados en un complejo proteico conocido como complejo silenciador inducido por ARN (en inglés RISC, *ARN-induced silencing complex*), en el que se piensa son convertidos a ARN de cadena sencilla por acción de otra enzima, una helicasa. El segundo paso es el reconocimiento del ARN mensajero blanco (de cadena sencilla) por la cadena complementaria del ARN interferente pequeño asociada al complejo silenciador (RISC), la cual sirve como guía para establecer interacciones tipo Watson-Crick con el ARN mensajero. Este proceso de reconocimiento es dependiente de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP; figura 1).

El ARN mensajero blanco apareado con el ARN interferente pequeño puede seguir dos caminos. En uno, el ARN mensajero se usa como molde para amplificar la señal interferente al ser convertido en ARN de doble cadena por una ARN polimerasa dependiente de ARN, la cual usa al ARN interferente pequeño “primario” como iniciador para sintetizar la cadena complementaria, y así generar nuevamente un ARN de doble cadena de mayor tamaño. Este ARN de doble cadena es degradado nuevamente por la enzima Dicer, generando así ARN interferentes pequeños “secundarios”, y amplificándose el fenómeno de interferencia, lo que aumenta la efectividad del sistema. Los ARN interferentes pequeños secundarios pueden reconocer al ARN mensajero en diferentes posiciones (hacia el extremo 5’ ó 3’ del ARN mensajero en relación con la secuencia reconocida por el ARN interferente pequeño primario), fenómeno que se conoce como “interferencia por ARN de carácter transitivo”. El término “transitivo” se refiere al movimiento de la señal de silenciamiento a lo largo de un gen particular, que en las plantas es en ambas direcciones (5’ y 3’, esto es, hacia el inicio y el final del ARN mensajero, respectivamente), mientras que en *C. elegans* es sólo en la dirección 5’. Por otra parte, en *Drosophila* y en mamíferos no parece suceder tal amplificación.

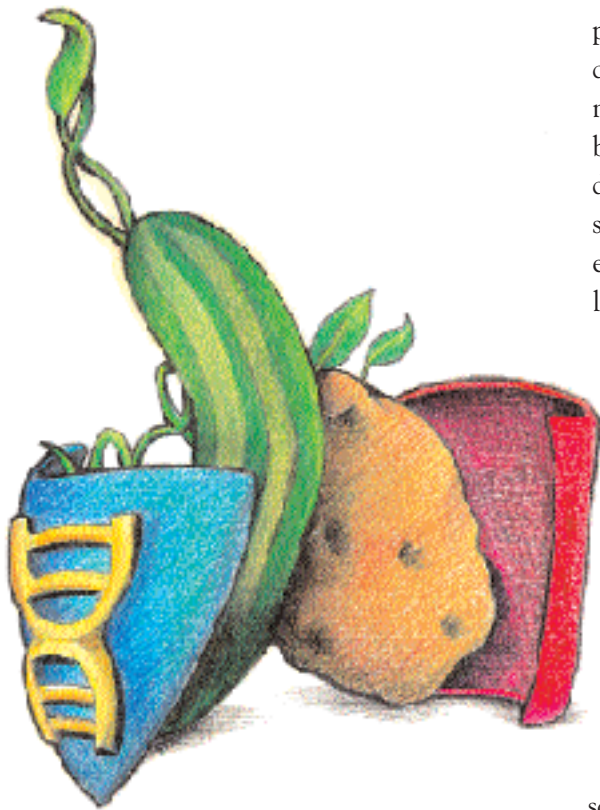
En el segundo camino posible, el ARN blanco apareado con la hebra complementaria del ARN interferente pequeño sufre un corte aproximadamente a la mitad del dúplex formado por el ARN blanco y el ARN interferente pequeño, el cual es aparentemente generado por una endorribonucleasa diferente a Dicer. El ARN cortado puede ser entonces degradado por completo por exorribonucleasas a fin de que el ARN mensajero no pueda ser traducido.

Por lo expuesto anteriormente se infiere que este proceso impide que un ARN potencialmente nocivo para la célula, o que requiere mantenerse regulado a niveles bajos (ver ejemplos más adelante), se replique o permanezca demasiado tiempo activo en la célula, y por lo tanto lo degrada; esto evita también que tal ARN se disemine hacia otras células del organismo. Por otro lado, la amplificación del ARN blanco por medio del efecto transitivo de la interferencia por ARN genera una mayor concentración de nuevos complejos silenciadores que ahora reconocen y degradan al ARN blanco en otras regiones del mismo, lo que aumenta la potencia de la interferencia por ARN sobre un ARN mensajero determinado.

Se infiere que este proceso impide que un ARN potencialmente nocivo para la célula, o que requiere mantenerse regulado a niveles bajos, se replique o permanezca demasiado tiempo activo en la célula, y por lo tanto lo degrada

## LA INTERFERENCIA POR ARN EN EL GUSANO *C. ELEGANS* Y EN PLANTAS

En estos organismos, además de amplificarse la señal interferente como se describió anteriormente, ésta se disemina de manera sistémica (esto es, a todo el organismo) o a otras partes del mismo, de manera que la inoculación con un virus en una región delimitada de una hoja confiere inmunidad a las células circundantes. Experimentos con injertos han mostrado que esta inmunidad viaja más de 30 centímetros en el tejido del tallo. El caso de *C. elegans* es aún más notable, ya que la inyección de ARN de doble cadena en alguna región del animal puede afectar la expresión del gen blanco



en todo el individuo, y aún más, el estado de silenciamiento de la expresión de un gen puede ser heredado a la siguiente generación del gusano (este fenómeno se ha mostrado para numerosos genes). El mecanismo a través del cual se hereda el estado de silenciamiento aún no se conoce.

Aunque la regulación de la expresión génica por la interferencia por ARN es principalmente a nivel post-transcripcional, en las plantas parece también funcionar a nivel transcripcional. El mecanismo de regulación transcripcional no está bien definido, aunque las evidencias sugieren que es a través de promover la metilación de los genes o promotores que comparten identidad con el ARN de doble cadena que disparó la interferencia por ARN, así como mediante la remodelación de la estructura de la cromatina. Esto último parece suceder también en la mosca *Drosophila*.

Las plantas también tienen la capacidad de inhibir la expresión de algunos transgenes (genes exógenos introducidos artificialmente y expresados abundantemente en las células de la planta). Esta inhibición se logra al montar una respuesta interferente contra el ARN mensajero del transgen, y si éste tiene identidad con ARN mensajeros propios, estos últimos también se inhiben, dando origen al fenómeno que se conoce como “co-supresión”. Este fenómeno se describió inicialmente en plantas de petunia en 1990, cuando al introducirles transgenes que codificaban una enzima que debiera dar una mayor pigmentación a los pétalos, el resultado fue el opuesto: pétalos blancos o “manchados” de blanco. Esta observación sorprendente sugirió no sólo que el gen introducido estaba inactivo, sino también que este elemento genético exógeno afectó la expresión del gen endógeno. Se ha propuesto que las ARN polimerasas dependientes de ARN celulares son los sensores que detectan ARN mensajeros derivados de transgenes, los cuales son reconocidos como aberrantes (por características aún no definidas, aunque en parte se cree que es por su gran abundancia). Para funcionar como sensores de ARN aberrantes, las ARN polimerasas dependientes de ARN deben ser enzimas con baja afinidad y modesta capacidad de elongación, lo que permitiría ignorar a los ARN celulares “sanos”.

Muchos de los elementos de la maquinaria enzimática involucrada en el fenómeno de interferencia por ARN parecen estar conservados en los diversos organismos en los cuales se ha caracterizado este sistema. Aunque sólo algunos de ellos han empezado a describirse, el análisis genético de mutantes de *C. elegans* y de la planta *Arabidopsis* de-

ficientes en interferencia por ARN sugieren que podrían estar involucrados varias decenas de genes. A continuación revisaremos algunas condiciones que activan la respuesta de interferencia por ARN.

## INFECCIONES VIRALES

El genoma de la gran mayoría de los virus que se conocen en la actualidad está formado por ARN (lo cual es particularmente cierto para los virus de plantas). El genoma de estos virus puede ser de ARN de cadena sencilla (más del 90 por ciento en el caso de los virus de plantas) o de doble cadena. En los virus de ARN de cadena sencilla, el genoma es replicado a través de intermediarios de ARN de doble cadena, los cuales pueden activar directamente la vía interferente. Debido a la capacidad potencial de este tipo de virus para activar la interferencia por ARN, una infección viral se puede ver entonces como una carrera entre la maquinaria de silenciamiento celular y la replicación del virus.

La evidencia más clara de la función de la interferencia por ARN como un sistema de defensa antiviral se deriva de estudios genéticos en plantas. Las plantas mutantes que son incapaces de montar una respuesta de interferencia por ARN son más susceptibles a infecciones virales; por ejemplo, mutantes de la planta *Arabidopsis thaliana* que son deficientes en la ARN polimerasa dependiente de ARN, que es uno de los componentes de la vía de interferencia por ARN (figura 1), son extremadamente sensibles a la infección por el virus del mosaico del pepino. Otra de las evidencias en favor del papel de la interferencia por ARN como sistema de defensa contra virus se basa en el hecho de que muchos de los virus de plantas activan eficientemente la vía de interferencia por ARN, y a la vez algunos de ellos, como el virus del mosaico del pepino y los virus X y Y de la papa, producen proteínas de contradefensa contra esta vía, que son capaces de bloquear el silenciamiento, y que por lo tanto juegan un papel esencial en la patogénesis viral. Esto mismo se ha observado en virus de insectos, como el virus de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), que también produce una proteína que bloquea la respuesta de interferencia por ARN en células en cultivo y que es esencial para la replicación del virus en estas células. Esto apoya la hipótesis de que la interferencia por ARN también funciona como un sistema de defensa antiviral en células animales. Sin embargo, aunque no se conoce la relevancia que este tipo de defensa pudiera tener en los mamíferos, recientemente se describió que el virus de la influenza, el

virus vaccinia y los reovirus producen también proteínas que bloquean la interferencia por ARN.

Estas observaciones sugieren que el mecanismo de interferencia por ARN seguramente sirvió como sistema de defensa efectivo contra los primeros patógenos, lo que justificaría su conservación a través de la evolución aún cuando aparecieron otros mecanismos de defensa ligados al aumento en la complejidad de los organismos vivos, como los anticuerpos y el interferón, en los vertebrados. Sin duda es interesante que este mecanismo ancestral esté todavía presente en muchos organismos actuales, en los cuales aparentemente continúa jugando un papel importante en el control de moléculas de ARN que son percibidas como extrañas.

La evidencia más clara  
de la función  
de la interferencia por ARN  
como un sistema de defensa  
antiviral se deriva  
de estudios genéticos  
en plantas

## TRANSPOSONES

Otra función atribuida a la interferencia por ARN es la de cuidar la integridad del genoma de posibles agentes que lo puedan alterar, como pueden ser los transposones. Una fracción importante de los genomas complejos está formada por elementos repetitivos, los cuales incluyen copias numerosas de transposones tanto defectuosos como activos. Los transposones son secuencias de ADN que tienen la capacidad de moverse de un lugar a otro dentro del genoma, con la potencialidad de alterar la función y estructura de los genes y acelerar así la evolución del organismo. Sin embargo, tienen también claramente la posibilidad de actuar como agentes mutagénicos con resultados adversos para el genoma, por lo cual es necesario mantener regulada su actividad. Una clase de estos elementos móviles, conocidos como retrotransposones, se amplifican dentro del genoma a través de un intermediario de ARN que tiene la posibilidad de formar ARN de doble cadena, y por lo tanto la capacidad de activar la interferencia por ARN.

Los retrotransposones son abundantes en eucariontes. En el maíz, por ejemplo, representan aproximadamente el 70 por ciento del ADN nuclear. La prueba más convincente de que la

interferencia por ARN es capaz de regular la actividad de los transposones es que en diversos organismos, incluyendo plantas, gusanos, hongos y algas, se ha encontrado que la transposición se incrementa en mutantes deficientes en el sistema de interferencia (esto es, cuando se pierde la función de un gen que forma parte de la ruta de interferencia por ARN). Queda aún por determinarse si esta función es operativa en mamíferos, y en particular en humanos, donde la secuencia completa del genoma reveló que tenemos un 45 por ciento de secuencias remanentes de invasiones ancestrales con elementos tipo transposón o retrovirus, muchos de los cuales podrían estar todavía activos. Debido a la capacidad para reprimir la proliferación de elementos móviles, al sistema de interferencia por ARN se le ha considerado “el sistema inmunitario del genoma”.

## ARN ENDÓGENOS

Además de proteger contra virus y transposones, algunos elementos del sistema de interferencia por ARN parecen estar involucrados en la regulación de la expresión de genes celulares, particularmente de aquellos que participan en el desarrollo y la diferenciación de los organismos. Los primeros indicios de esto fueron resultado del análisis de mutantes de la planta *Arabidopsis* y de la mosca de la fruta *Drosophila*, que mostraban deficiencias en alguno de los componentes del sistema de interferencia por ARN. Estos organismos mutantes presentaron diversos problemas en su desarrollo temprano. La evidencia más sólida se ha obtenido en mutantes de *C. elegans*, donde se han alterado más de uno de los elementos del sistema, generándose en cada caso problemas en el desarrollo del gusano.

El análisis de estos mutantes reveló la existencia de una nueva clase de reguladores negativos de la expresión génica. Estos reguladores, que inicialmente fueron llamados ARN temporales pequeños y en la actualidad se conocen de forma genérica como micro-ARNs (por ejemplo, *let-7* y *lin-4* en *C. elegans*), se transcriben como precursores de 60 a 70 bases y forman una estructura de tallo y asa (figura 2) que es procesada

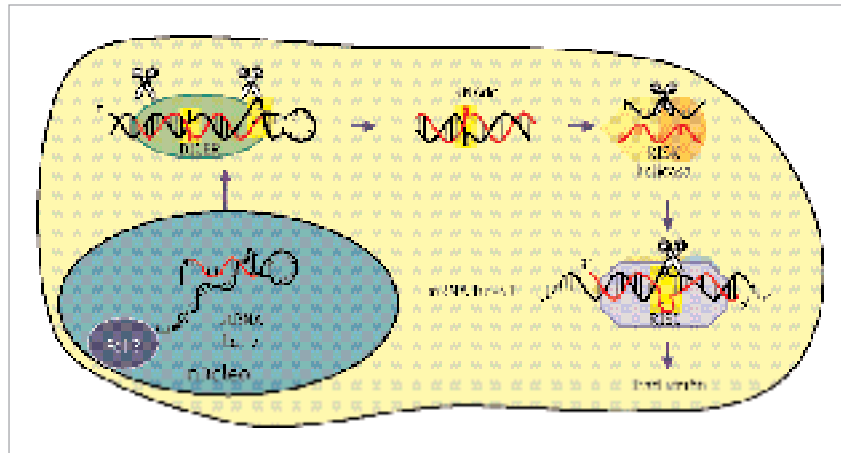
por la maquinaria de interferencia por ARN para dar un ARN de doble cadena, que es la forma activa del micro-ARN. El mecanismo de regulación mediada por micro-ARNs usa algunos de los componentes de la maquinaria de interferencia por ARN, y resulta en la inhibición de



la síntesis de proteínas. Sin embargo, esta inhibición se da a través de un mecanismo diferente al de la degradación del ARN mensajero inducida por la interferencia por ARN. El micro-ARN de doble cadena, previa separación de sus hebras, se une al ARN mensajero blanco como parte de un complejo proteico que inhibe la traducción sin degradar el ARN mensajero. A diferencia del ARN de doble cadena que activa la interferencia por ARN e induce la degradación del ARN mensajero, la secuencia de los micro-ARNs no es idéntica a la del ARN mensajero blanco (figura 2).

Hasta ahora *let-7* y *lin-4* son los únicos dos micro-ARNs para los cuales se ha demostrado una función regulatoria. Sin embargo, éstos forman parte de una familia creciente. Se han identificado hasta ahora más de 150 micro-ARNs en *Drosophila*, *C. elegans*, mamíferos y más recientemente en plantas, y aunque se desconoce su función, su abundancia sugiere que cuando menos algunos de ellos tendrán también un papel regulatorio. En este sentido, en la mosca *Drosophila melanogaster* se han reportado micro-ARNs que son parcialmente complementarios a dos secuencias (conocidas como cajas *K* y *Brd*) que están involucradas en la regulación post-transcripcional de muchos ARN mensajeros.

Los micro-ARNs y ARN interferentes pequeños, como parte integral de su respectivo complejo de silenciamiento, inhiben la traducción del ARN mensajero blanco, pero mientras los ARN interferentes pequeños degradan al ARN mensajero, los micro-ARNs sólo lo secuestran temporalmente. Para ser efectivos, los ARN interferentes pequeños deben tener una secuencia cien por ciento complementaria al ARN mensajero blanco, lo cual no es un requerimiento para los micro-ARNs, ya que éstos se unen a su blanco con algunas imperfecciones, lo cual aparentemente es el sello distintivo de estas moléculas reguladoras (figura 2).



**Figura 2.** La interferencia por ARN efectuada por los ARN temporales pequeños. Se ejemplifica la inactivación del ARN mensajero del gen *lin-41* por el micro-ARN *let-7* (STRNA LET-7 en la figura) en *C. Elegans*. El ARN del gen *let-7* se transcribe como un precursor de 70 nucleótidos por una ARN-polimerasa no identificada. En el citoplasma, Dicer procesa a *let-7* generando el ARN de doble cadena funcional que se incorpora al complejo silenciador. La cadena positiva (en rojo) sirve de guía para reconocer a su blanco ARN mensajero-*lin14*, con el cual forma un híbrido. El ARN mensajero no se corta ni se degrada, sólo se impide la traducción, por un mecanismo no conocido. Se señalan (en amarillo) las zonas no apareadas entre el micro-ARN y el ARN mensajero blanco, en el complejo *let-7-lin14*, lo que se cree que hace la diferencia con respecto a la interferencia por ARN degradativa disparada por ARN de doble cadena.

En la mosca  
*Drosophila melanogaster*  
se han reportado micro-ARNs  
que son parcialmente  
complementarios  
a dos secuencias  
que están involucradas  
en la regulación  
post-transcripcional  
de muchos ARN mensajeros

**DESARROLLO DEL SISTEMA  
DE INTERFERENCIA POR ARN  
COMO HERRAMIENTA METODOLÓGICA**

Dado que el fenómeno de interferencia por ARN resulta en el silenciamiento eficiente y específico de la expresión de un gen dado, recientemente se ha implementado su uso en una amplia

variedad de organismos para alterar la expresión de genes de interés, y definir así su función. Este sistema ha sido aplicado con particular éxito en *C. elegans*, *Drosophila* y en plantas. Por ejemplo, en el caso de *C. elegans*, la evaluación por interferencia por ARN de la función de genes individuales se ha extendido al análisis de casi el total de los 19 mil genes predichos para

Con base en la secuencia  
de ADN de un gen,  
se puede sintetizar  
un ARN de doble cadena  
que bloquee  
de manera potente  
y específica  
la expresión del gen

este organismo, habiéndose podido determinar la función de un gran número de genes para los cuales no se conocía.

Con base en la secuencia de ADN de un gen (lo cual en esta era acelerada de secuenciación de genomas completos pareciera no ser ya una limitante), se puede sintetizar un ARN de doble cadena que bloquee de manera potente y específica la expresión del gen. Esto ofrece una alternativa rápida a la laboriosa generación de organismos “*knockout*”, los cuales son manipulados genéticamente para que pierdan el gen de interés. Por ejemplo, en *C. elegans*, los ARN de doble cadena se pueden introducir por diferentes métodos, incluyendo la microinyección, la suplementación del alimento del gusano con ARN de doble cadena desnudo, o con bacterias que expresan el ARN de doble cadena, o simplemente sumergiendo al nemátodo en una solución de ARN de doble cadena.

Esta tecnología no pudo aplicarse a animales vertebrados por largo tiempo, debido a que en las células de estos organismos existen otros sistemas (inducibles por interferón) que responden a la presencia de ARN de doble cadena provocando la muerte de las células a través de un mecanismo conocido como *apoptosis*. En células de vertebrados, el ARN de doble cadena causa la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas, y eventualmente la apoptosis, a través de dos vías. En la primera, el ARN de doble cadena activa una proteína cinasa, llamada PKR, y la PKR activada, a su vez, fosforila e inactiva el factor de inicio de la traducción eIF2a, lo que lleva a la represión total de la síntesis de proteínas. En la segunda vía, el ARN de doble cadena activa indirectamente a una ribonucleasa, la ARNasa L, la cual degrada todos los ARN mensajeros celulares de manera no específica. Sin embargo, en el 2001 se describió que fragmentos sintéticos de ARN de doble cadena de 21 a 23 pares de bases, equivalentes a los ARN interferentes pequeños que se generan *in vivo* por la enzima Dicer, son capaces de estimular el sistema de interferencia por ARN sin despertar la respuesta celular inespecífica mediada por las enzimas PKR y ARNasa L, la cual para su inducción requiere de moléculas de ARN de doble cadena de más de 30 pares de bases. Dado que los ARN interferentes pequeños pueden ser sintetizados químicamente y evaluados con rapidez, la observación anterior ha abierto la posibilidad de realizar estudios, que empiezan a ser numerosos, para determinar la función de genes en células de vertebrados, particularmente en mamíferos. Sin lugar a dudas, esta metodología tendrá un impacto tan revolucionario en el estudio de la función de los genes de un organismo como la técnica de amplificación de ácidos nucleicos, conocida como reacción en ca-

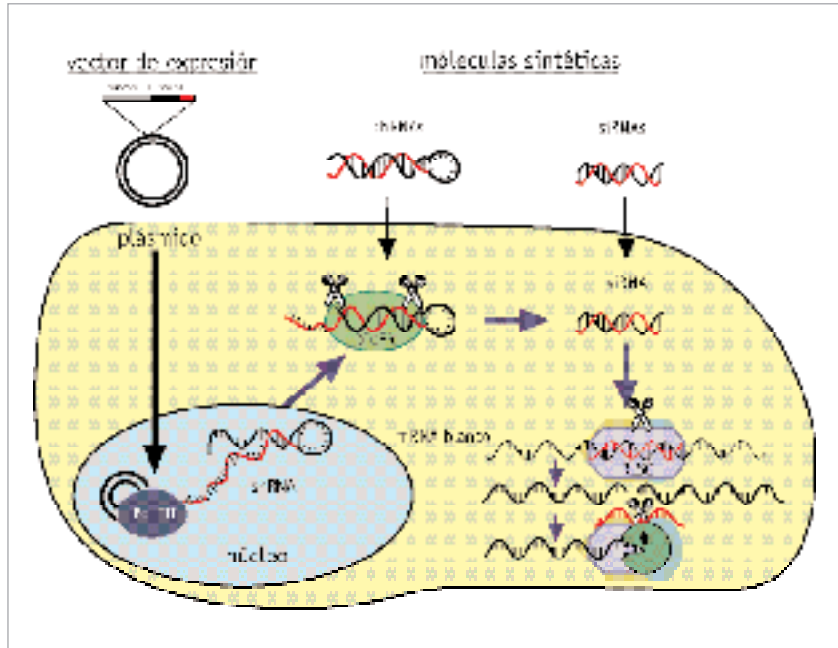


dena de la polimerasa, o como las herramientas de transgénesis, utilizadas para la generación de organismos modificados genéticamente.

Actualmente, el método más usado para suprimir la expresión de un gen por la interferencia por ARN en células en cultivo consiste en introducir los ARN interferentes pequeños a las células mediante la ayuda de liposomas (vesículas de lípidos que se fusionan con la membrana celular). Este método, sin embargo, tiene varias desventajas, incluyendo el hecho de que la eficiencia de lipofección, es decir, el número de células a las que se les puede introducir el ARN interferente pequeños, es relativamente

bajo y variable. La otra desventaja de esta metodología es que los ARN interferentes pequeños sintéticos tienen un efecto transitorio (de tan sólo algunos días) en el interior de la célula. Esto, aunado al hecho de que aparentemente los mamíferos carecen de mecanismos de amplificación del silenciamiento, ha motivado la búsqueda de alternativas para potenciar o prolongar el efecto interferente de los ARN interferentes pequeños, algunas de las cuales se describen a continuación.

Varios grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar vectores de expresión para células de mamífero que produzcan cantidades elevadas y constantes de ARN interferentes pequeños intracelularmente, con el fin de mantener activa la respuesta de interferencia por ARN. Así se puede inhibir de manera estable la expresión de genes celulares. La estructura de los precursores de los micro-ARNs sirvió de base para diseñar los llamados ARNs pequeños en horquilla, que se transcriben a partir de los vectores de expresión, los cuales tienen estructuras de tallo y asa que son reconocidos y procesados por la enzima Dicer, para dar lugar a ARN interferentes pequeños que inducen la degradación del ARN mensajero blanco (figura 3). Para controlar el tamaño de los ARNs pequeños en horquilla, éstos se transcriben a partir de promotores celulares reconocidos por la ARN polimerasa III, que sintetiza ARNs pequeños e inicia y termina la transcripción en sitios bien definidos. De esta manera se ha podido silenciar de manera potente y estable la expresión de genes en células de mamífero en cultivo, de manera similar a como se había logrado previamente en organismos invertebrados,



**Figura 3.** La ruta de interferencia por ARN en células de los mamíferos. Sólo los ARN interferentes pequeños pueden activar la interferencia por ARN en estos organismos sin despertar respuestas celulares inespecíficas hacia ARN de doble cadena. Estos ARN interferentes pequeños pueden ser sintéticos y ser administrados por medio de liposomas o ser generados a partir de ARNs pequeños en horquilla (shRNA en la figura). Los ARNs pequeños en horquilla pueden ser también sintéticos o ser transcritos a partir de vectores de expresión que procesa intracelularmente la ARNasa Dicer. Cada ARN interferentes pequeños se incorpora a un complejo silenciador, que a su vez puede reconocer un ARN mensajero blanco tomando como guía a la cadena negativa (en rojo) del ARN interferente pequeño. El ARN mensajero es cortado y degradado en su totalidad para evitar su traducción. Los ARNs pequeños en horquilla se basan en la estructura de los micro-ARNs (figura 2), pero a diferencia de éstos, los ARNs pequeños en horquilla sí degradan al ARN mensajero blanco. Los ARNs pequeños en horquilla se transcriben a partir de promotores reconocidos por la ARN-polimerasa III que inicia y termina la transcripción de ARNs cortos en sitios bien definidos.

incluyendo *C. elegans*, *Drosophila* y otros insectos, así como en protozoarios.

## PERSPECTIVAS

El conocimiento de la secuencia de genomas completos de diversos organismos, y en particular la del genoma humano, es de suma importancia. Sin embargo, es todavía mucho más lo que nos resta por aprender en relación al funcionamiento de cada uno de los genes de este patrimonio hereditario, así como de las interacciones que existen entre ellos.

Sin lugar a dudas, uno de los métodos más informativos para determinar la función de un

gen, que se ha utilizado durante largo tiempo, es anular la función del gen de interés y observar el resultado de esta manipulación. Es claro que la interferencia por ARN está evolucionando como una herramienta extremadamente poderosa para este fin. Así, se están realizando esfuerzos para analizar el genoma completo de *C. elegans*, evaluando las consecuencias de inhibir uno por uno todos sus genes. Enfoques similares se están llevando a cabo en otros organismos, incluyendo plantas, y en un esfuerzo realizado por un grupo de laboratorios se está llevando a cabo la inhibición individual de la expresión de cada gen del genoma humano, utilizando como sistema de análisis células en cultivo y ARNs pequeños en horquilla, lo cual permitirá tamizajes genéticos de pérdida de función a gran escala, así como la evaluación rápida de las interacciones genéticas que ocurren en células de mamífero. Los resultados parciales de este esfuerzo acaban de ser publicados recientemente en la revista *Nature*.

Dada la posibilidad de inhibir de manera eficiente la expresión de un gen a través de interferencia por ARN, se ha propuesto también que este sistema pudiese tener aplicaciones terapéuticas, al inhibir la producción de proteínas involucradas en el establecimiento o progresión de una enfermedad (por ejemplo proteínas responsables de la interacción huésped-parásito, o involucradas en la replicación del patógeno, en oncogénesis o en toxicidad celular). El efecto antiviral específico de este sistema ya ha sido demostrado en células en cultivo para el virus sincicial respiratorio, el poliovirus y el virus de la inmunodeficiencia humana. Asimismo, se demostró la efectividad de la interferencia por ARN para inhibir la replicación de los rotavirus, agentes causantes de gastroenteritis infantiles, para los cuales este sistema ofrece la oportunidad de desarrollar un método para realizar genética reversa (substitución de una proteína en las partículas virales por otra equivalente, que porte mutaciones dirigidas en sitios de interés que permitan evaluar la función de la proteína), objetivo que ha evadido el esfuerzo de los investigadores en el campo por largo tiempo (figura 4). Estos primeros resultados antivirales de la interferencia por ARN sugieren que la inhibición de la expresión genética por ARN interferentes pequeños será un enfoque terapéutico novedoso para enfermedades infecciosas, una vez que puedan desarrollarse métodos eficientes para administrar los ARN interferentes pequeños a organismos completos.

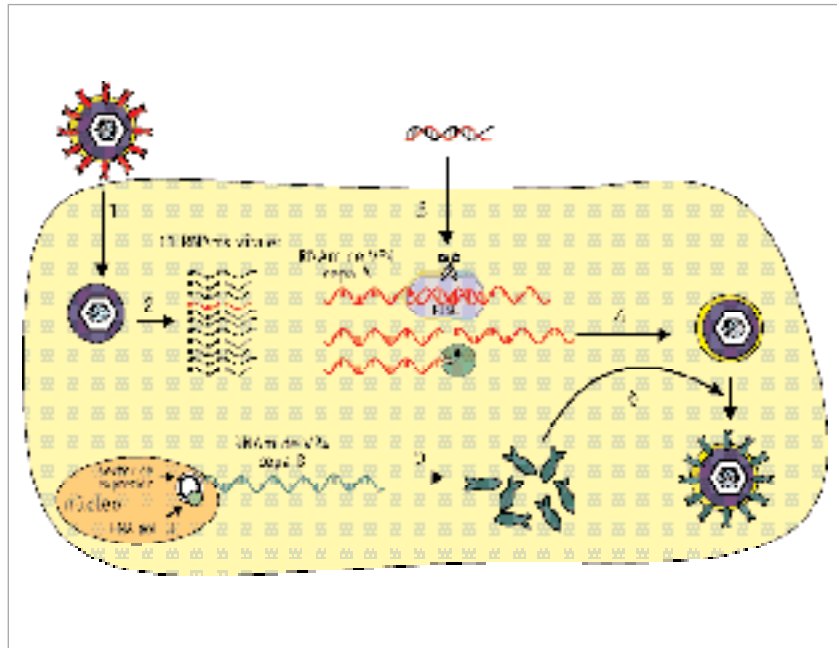
Mientras esto se logra, el tratamiento *ex vivo* con vectores que expresen establemente ARN interferentes pequeños pudiese ser aplicado para combatir enfermedades virales crónicas tan importantes como el sida. En este caso se pudieran extraer cé-

Se están realizando esfuerzos para analizar el genoma completo de *C. elegans*, evaluando las consecuencias de inhibir uno por uno todos sus genes

lulas de la médula ósea de una persona infectada y tratarlas con ARN interferentes pequeños dirigidos contra el genoma viral o contra un receptor celular necesario para la infección (por ejemplo, CCR5) para después ser reimplantadas, y dar origen a células ahora resistentes a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.

La expresión de ARNs pequeños en horquilla a partir de vectores virales que se están evaluando actualmente para la administración de genes en protocolos de terapia génica, como son los adenovirus, los virus adenoasociados o los retrovirus, entre otros, ofrece una vía importante para silenciar genes específicos *in vivo*. Se ha reportado ya el uso de retrovirus como vectores de expresión para ARNs pequeños en horquilla, que han inhibido de manera eficiente la expresión de genes endógenos de la célula. Además de esto, y yendo más lejos, los primeros estudios de este tipo han demostrado que la inoculación por vía sanguínea de adenovirus recombinantes que expresan un ARN pequeño en horquilla específico para el ARN mensajero de la enzima beta-glucuronidasa, disminuyeron los niveles de esta enzima en el hígado del animal, la cual se expresa abundantemente en este órgano. Igualmente la administración intracraneal en un ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente con un adenovirus que codifica un ARNs pequeño en horquilla homólogo al ARN mensajero de la proteína verde fluorescente hizo que disminuyera la expresión de esta proteína.

Una aplicación terapéutica importante de la interferencia por ARN sería reducir la expresión de productos génicos tóxicos que están asociados a enfermedades hereditarias dominantes, tales como algunos desórdenes neurodegenerativos. Por ejemplo, las repeticiones largas del aminoácido glutamina en algunas proteínas causa que éstas se agreguen, causando varios tipos de enfermedades neurodegenerativas. Un estudio reciente demostró que la utilización de adenovirus recombinantes que expresan ARNs pequeños en horquilla homólogos a ARN mensajeros que codifican a estas proteínas puede reducir su contenido en células neuronales crecidas *in vitro*, con la correspondiente disminución en la cantidad de proteína agregada.



**Figura 4.** La interferencia por ARN en el estudio de la función de los genes de rotavirus. La cepa A de rotavirus, compuesta por tres capas de proteínas (espículas en rojo) ingresa a una célula, proceso durante el cual pierde la capa más externa (paso 1). En el citoplasma celular el virus con doble capa protéica transcribe sus genes a ARN mensajeros, los cuales codifican las proteínas virales, incluida VP4, proteína que forma las espículas del virus (paso 2). La lipofección de la célula con ARN interferentes pequeños que degradan específicamente al ARN mensajero de VP4 (espículas en rojo) y evita la síntesis de esta proteína de manera selectiva (paso 3). Se ensamblan partículas de rotavirus con tres capas, pero sin espículas (paso 4). La introducción a la célula de un vector de expresión que dirige la síntesis de VP4 de una cepa diferente a la cepa A (cepa B, espículas en verde) (paso 5), la cual no es afectada por la interferencia por ARN, propiciará que nuevamente se ensamblen virus completos (paso 6), en un proceso denominado "rescate fenotípico". Esto último permitirá realizar mutaciones en la proteína VP4 y observar el efecto sobre el comportamiento de esos nuevos virus.

Aunque la utilización de la interferencia por ARN para tratar enfermedades que se caracterizan por la expresión inadecuada de proteínas mutantes o silvestres queda todavía por demostrarse, no hay duda de que esta tecnología ofrece, cuando menos en principio, revolucionar la forma como se lleva a cabo la investigación en la era post-genómica.

## Bibliografía

Déctor, M. A., P. Romero, S. López y C. F. Arias (2002), "Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs", *EMBO Reports* 3(12): 1175-1180.

Fire, A., S., Xu, M. K., Montgomery, S. A, Kostas, S. E., Driver y C. C. Mello (1998), "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 391:806-811.

Hannon, G. J. (2002), "RNA interference", *Nature* 418:244-251.

Jorgensen, R. (1990), "Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes", *Trends Biotechnol*, 8:340-344.

Novina, C. D., M. F., Murray, D. M., Dykxhoorn, P. J., Beresford, J., Riess, S.-K., Lee, R. G., Collman, J., Lieberman, P., Shankar, y P. A., Sharp (2002), "siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection", *Nature Med.*, 8:681-686.

Paddison, P.J., J.M. Silva, D.S. Conklin, M. Schlabach, M. Li, S. Aruleba, V. Balija, A. O'shaughnessy, L. Gnoj, K. Scobie, K. Chang, T. Westbrook, M. Cleary, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, S. J. Elledge, y G. J. Hannon (2004), "A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals", *Nature*, 428:427-31.

Plasterk, R. H. A. (2002), "RNA silencing: the genome's immune system", *Science*, 296:1263-1265.

Xia, H., Q. Mao, H. L., Paulson y B. L., Davidson (2002), "siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*", *Nature Biotechnol.*, 20:1006-1010.

---

**Miguel Ángel Déctor Carrillo** estudió la licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad Veracruzana: obtuvo la maestría en Ciencias en la Universidad Autónoma del Estado de Nuevo León y el doctorado en Ciencias Bioquímicas en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Actualmente es profesor-investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León.  
mdector@ibt.unam.mx

**Carlos F. Arias** obtuvo la licenciatura en la Facultad de Química y el doctorado en Investigación Biomédica Básica de la Universidad Nacional Autónoma de México. Realizó estudios postdoctorales en el Instituto Tecnológico de California. Actualmente es investigador del Instituto de Biotecnología de la UNAM, donde trabaja en la epidemiología y biología molecular de los rotavirus, agentes causales de gastroenteritis en niños. Ha sido profesor invitado en el Instituto Tecnológico de California y en el Centro Nacional de la Investigación Científica de Francia. Entre sus distinciones se encuentran el premio de la Academia Mexicana de Ciencias, el Premio Carlos J. Finlay de la UNESCO y el nombramiento de investigador internacional del Instituto Médico Howard Hughes, desde 1991 a la fecha. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores y miembro del comité editorial del *Journal of virology*.  
arias@ibt.unam.mx

