

Estrategias terapéuticas con RNA de interferencia para enfermedades hepáticas

Título Corto:

RNA de interferencia una terapia potencial en las enfermedades hepáticas

López-de la Mora David Alejandro², Sánchez-Roque Cibeles M. Ciboney¹

¹Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México

²Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara, Tonalá, México.

Para citar este artículo:

López-de la Mora, D. A., Sánchez-Roque, C.M.C. (Enero 2017). Estrategias terapéuticas con RNA de interferencia para enfermedades hepáticas. *Revista Acta de Ciencia en Salud*, 2(1), 51-62.

Resumen:

Las enfermedades hepáticas son un problema de gran impacto económico y social, pues son enfermedades crónicas que tienen consecuencias graves, algunas irreversibles; pudiendo llegar a limitar el desempeño laboral. Las enfermedades del hígado constituyen una de las primeras causas de muerte en muchos de los países desarrollados. La etiología del daño hepático es muy variada, pudiendo ser viral (virus de la hepatitis C o B), por consumo excesivo de alcohol, ingesta crónica de fármacos hepatotóxicos, enfermedades metabólicas, etc. El tratamiento para la enfermedad hepática es limitado y generalmente poco efectivo, por lo que existe una búsqueda constante de nuevas terapias. Una de las nuevas propuestas

terapéuticas es el RNA de interferencia (iRNA) que ha demostrado un enorme potencial, en el estudio de mecanismos celulares que se fundamentan en la pérdida de función de un gen. En el caso de las enfermedades hepáticas, el empleo del RNA de interferencia se ha enfocado a suprimir funciones fibrogénicas, inflamatorias o inhibir la replicación viral en el caso del virus de hepatitis C o B. Estas estrategias terapéuticas han sido exitosas en cultivos celulares o modelos animales como validación de la prueba de concepto, por lo que en la próxima década se esperan aplicaciones clínicas de los RNAs de interferencia sobretodo en el área de enfermedades crónico-degenerativas e infecciones virales.

Abstract:

Hepatic diseases are a problem of great economic and social impact, since they are chronic diseases that have serious consequences, some of them irreversible and that can limit the labor performance. Liver diseases constitute one of the main cause of death in most of the developed countries. The etiology

of the hepatic damage is very varied, like viral (virus of the hepatitis C or B), excessive consumption of alcohol, chronic ingestion of hepatotoxic drugs, metabolic diseases, etc. Actual treatment for hepatic disease is limited and generally not effective, for that reason there exists a constant search of new

therapies. One of the new therapeutic offers is the interference RNA (iRNA) that has demonstrated an enormous potential, in the study of cellular mechanisms that are based on the loss of function of a gene. In the case of hepatic diseases, the employment of the iRNA has focused in suppressing fibrogenic functions, inflammation or inhibits viral replication in case of hepatitis C or B virus. These therapeutic strategies have demonstrated success

in cell cultures or animal models as validation of the proof of concept, base on this in the next decade it is expected that interference iRNAs can be taken to clinical applications, especially in the field of chronic-degenerative diseases and viral infections.

Palabras clave: siRNA, Hepatitis C Virus, fibrosis, RNA interference, Knock out Genes

El hígado y sus patologías

El hígado es un órgano estructural y funcionalmente heterogéneo y es considerado el segundo órgano más complejo después del cerebro (1). Una de las enfermedades crónicas más frecuentes del hígado es la cirrosis hepática (CH), que se encuentra en las 10 primeras causas de muerte en el mundo occidental. En México la CH ocupa el 4º lugar en la mortalidad general, además de ser una importante causa de morbilidad (2,3).

La CH es un proceso difuso caracterizado por fibrosis y conversión de la arquitectura hepática normal a nódulos estructuralmente anormales (4). Existen consecuencias de la cirrosis hepática sobre la salud del individuo, mismas que dependen fundamentalmente del grado de funcionalidad que el hígado conserva a pesar de la alteración histológica. La CH es el resultado de un daño acumulado habitualmente durante varios años, que se caracteriza por la presencia de fibrosis en el tejido hepático (4,5). La fibrosis es ocasionada por el depósito excesivo de proteínas de matriz extracelular en el hígado, particularmente en el Espacio de Disse ubicado entre el sinusoides y los hepatocitos. El diagnóstico de CH se basa en el análisis histológico de una biopsia hepática que demuestre nódulos de regeneración por el acúmulo de fibras que aíslan áreas de tejido hepático. Estos septos fibróticos alteran la arquitectura del órgano y dificultan el intercambio de moléculas de secreción, depuración y nutrientes entre los hepatocitos y los sinusoides (6).

Entre las principales causas de la CH se encuentran las hepatitis crónicas por virus tipo C (Hepatitis C o HCV), virus tipo B (Hepatitis B o HBV) y virus tipo A (4).

Infeción crónica por virus de hepatitis C y subtipos A y B

La hepatitis A es causada por un virus de RNA desnudo de la familia Picornaviridae, puede estar activo en el medio ambiente durante semanas, pero es inactivado si se calienta a más de 85° C durante 1 minuto o por la exposición al hipoclorito de sodio (comúnmente conocido como “cloro”). No existe algún animal que funcione como reservorio de la infección (7). Según la OMS esta enfermedad afecta a 1.5 millones de personas anualmente (8).

El Virus de la Hepatitis A (HAV por sus siglas en ingles) se replica en el hígado, se excreta en la bilis y se elimina en la heces. El grado máximo de infección se produce durante las 2 semanas antes de la aparición de la ictericia. La forma de transmisión mas común es el contacto de persona a persona en los hogares extendiéndose así a toda la familia. Pero también se puede transmitir por agua contaminada con heces fecales de alguna persona infectada con HAV.(7)

No existe un tratamiento específico para el HAV pero la mayoría de las personas infectadas logra recuperarse sin haber presentado consecuencias en el

hígado. La muerte por insuficiencia hepática aguda o casos que requieran trasplante a consecuencia del HAV se produce menos del 1% de los casos presentados por esta enfermedad.(9)

Por otra parte el virus de la hepatitis B (HBV por sus siglas en inglés) a pesar que existen vacunas muy efectivas para su prevención esta enfermedad ha prevalecido durante aproximadamente 25 años, cerca de 400 millones de personas están infectadas alrededor del mundo.(10)

El HBV es un virus de DNA hepatótrofo no citopático de la familia Hepadnaviridae, con una prevalencia alta en Asia y África principalmente. Aproximadamente el 5% de los individuos desarrollan una infección crónica. La mayoría de los pacientes con infección crónica siguen siendo asintomáticos y no hay daño hepático potencialmente mortal, el resto (10-30%) de los pacientes desarrollan cirrosis hepática con posible progresión a cáncer de hígado.(11)

Entre las enfermedades hepáticas la hepatitis C es una de las más importantes ya que afecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo (12). El virus establece una infección persistente en el hígado, dando lugar progresivamente a la hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (13). Los seis principales genotipos del HCV difieren en su secuencia nucleotídica más del 30% y presentan un curso clínico y una distribución geográfica variable.

Los genotipos 1a y 1b son los más comunes en Europa occidental y América del Norte, y los genotipos 2 y 3 se detectan con menor prevalencia en estas regiones. El genotipo 4 se encuentra comúnmente en Egipto, el genotipo 5 en Sudáfrica y el genotipo 6 en el sudeste de Asia (14).

El virus usualmente se transmite por vía percutánea y la transmisión perinatal es poco común. Las infecciones por HCV son particularmente comunes en individuos infectados con virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), usuarios de drogas intravenosas, sus parejas sexuales e internos de centros penitenciarios (15). Las infecciones agudas por HCV suelen ser asintomáticas o asociadas con síntomas leves. Sin embargo, el virus tiene una tendencia a persistir en el 60-80% de los casos (16).

El mecanismo de hepatocarcinogénesis relacionada con el HCV no está totalmente dilucidado y es probable que implique efectos virales directos, indirectos y relacionados con el genotipo del virus (17).

El HCV es miembro de la familia Flaviviridae y se clasifica dentro del género Hepacivirus. El virión del HCV está envuelto y contiene un genoma de RNA de cadena sencilla sin capa de 9.6 kb. Un sitio interno de entrada ribosomal (IRES por sus siglas en inglés), responsable de la traducción inicial, se encuentra dentro de la región 5' No Traducida (5'-NTR) del genoma del HCV. El genoma del HCV codifica para un solo marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés), flanqueado por la región 5'-NTR y 3'-NTR. La poliproteína precursora es procesada por escisión proteolítica generando 10 proteínas virales: C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Las proteínas de la envoltura están codificadas por E1 y E2, el núcleo viral es derivado de la secuencia C. Las proteínas no estructurales (NS2, NS3 y NS4A) juegan un papel importante en el montaje de la proteasa viral formando un compartimento de membrana especializado para el replicón viral (NS4B) (Figura 1). La proteína hidrofóbica p7 forma un canal iónico y es crítica para la inefectividad del virión (18), (19).

Un análogo de la proteína F ha sido recientemente descrito, se genera por la iniciación de la traducción en AUG y el marco de lectura ribosomal en el codón 11 aproximadamente. Esta proteína se expresa durante la infección natural, pero su función aún no se determina (20). A diferencia del HBV, el ciclo de vida del HCV es citoplasmático. La replicación del virus de la hepatitis C implica la formación de menos RNA y dsRNAs intermediarios dentro del retículo endoplasmico.

Aunque el dsRNA del HCV activa cascadas de señales para la respuesta inmune innata, los efectos celulares con funciones antivirales son contrarrestados por las proteínas E2, NS3 y NS5A (21), (22). La heterogeneidad de secuencia y la rápida evolución de las cuasiespecies son características de la infección por el HCV. Esto se debe a la alta tasa de error de la polimerasa de RNA dependiente de RNA codificada por NS5B. La variabilidad de secuencia no está distribuida uniformemente por todo el genoma, y la secuencia 5'-NTR parece estar particularmente

bien conservada. Las características estructurales de esta región, que determinan su función como un IRES, probablemente imponen la conservación de la secuencia (17). La replicación del HCV in vivo alcanza una viremia máxima de alrededor de 10⁶ equivalentes de genoma por mililitro de suero en los chimpancés. Análisis de sensibilidad indican que el HCV se replica activamente en sólo unos pocos hepatocitos o en un nivel bajo en todo el hígado (23).

Modelos experimentales del virus de hepatitis C

La propagación del HCV en cultivos celulares ha sido difícil de lograr, y la reproducción exitosa de la replicación del HCV in vitro ha sido recientemente descrita. Los sistemas de replicación subgenómico se han utilizado con éxito para estudiar aspectos de la replicación del HCV y evaluar la eficacia terapéutica de los agentes antivirales. Estos replicones no poseen las secuencias estructurales que se requieren para producir viriones infecciosos, y tienen mutaciones que permiten la propagación en cultivos celulares (19). Actualmente los modelos in vivo disponibles de la infección por HCV son limitados e incluyen el chimpancé y los quiméricos ratones inmunodeficientes que se injertan con hepatocitos humanos. (17)

Terapias actuales contra el virus de hepatitis C

Hasta el momento no existen vacunas para el virus de hepatitis C (24). La dificultad de erradicar esta enfermedad se atribuye a las limitadas opciones de tratamiento existentes y la insatisfactoria eficacia de los mismos (25). La terapia actual para la infección crónica por el HCV implica una extendida dosificación con interferón pegilado (PEG-IFN) y ribavirina (RBV), combinación que es considerada el tratamiento más eficaz (26), (24). Este régimen ofrece una respuesta virológica sostenida en alrededor del 50% de los pacientes infectados por el genotipo 1 del HCV, que es el genotipo prevalente en los Estados Unidos, Europa y Japón. En contraste los pacientes infectados con genotipos 2 o 3 tienen un 80% de respuesta virológica sostenida. La terapia con PEG-IFN más RBV se ha asociado con efectos secundarios graves como neutropenia, trombocitopenia y anemia (27). Las inexorables consecuencias de la infección crónica con el HCV, así como las limitaciones del tratamiento actual han creado

una demanda de nuevos tratamientos a desarrollar. (28) Recientemente, una pequeña molécula (BIL-ND 2061) inhibidor de la proteasa NS3 ha mostrado ser más eficiente que la terapia de interferón combinado con ribavirin en ensayos clínicos restringidos. (29)

Una de las propuestas más novedosas para inhibir la replicación del HCV es el uso del silenciamiento de genes empleando RNA de interferencia (RNAi). El descubrimiento de estas moléculas de RNA que regulan la expresión de genes ha sido uno de los más grandes avances en la biología en las últimas décadas (30,31).

RNA de interferencia

El silenciamiento de genes por RNA de interferencia es un mecanismo muy bien conservado en la naturaleza, altamente eficiente y específico, en el que moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) regulan la expresión de genes (32,30). Este mecanismo se describió in vitro utilizando extractos de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Los estudios revelaron que moléculas largas de dsRNA eran cortadas en fragmentos pequeños con una estructura específica de dos cadenas de 21 a 25 nucleótidos, donde 19 nucleótidos son complementarios y dos nucleótidos en los extremos se encuentran sin aparearse. Estas moléculas son a lo que se llama RNA interferentes pequeños (siRNA; por sus siglas en inglés small interfering RNA) y se demostró que son las mediadoras en el proceso de interferencia de la expresión génica.

El uso de RNAi provoca una fuerte respuesta citotóxica en células de mamíferos, lo que lleva a la degradación no específica del RNA transcrito y un paro general de la traducción de proteínas de la célula huésped. Este problema se ha resuelto utilizando un siRNA sintético (menos de 30 pb) que es suficientemente largo para mediar la supresión de genes específicos, pero es lo suficientemente corto como para evadir los efectos adversos del dsRNAs. (34). Los siRNAs se han encontrado de manera endógena en una variedad de organismos. Para su uso experimental son producidos de manera sintética y dirigidos a un mRNA específico de células de mamíferos. Naturalmente son producidos a partir de precursores de RNA de doble cadena que pueden

variar de tamaño y origen. Estos precursores son procesados a siRNA por un tipo de RNAsa tipo III, conocida como DICER. En general, el siRNA de doble cadena de menos de 30 pares de bases no induce la respuesta inmune antiviral por interferón (IFN). Los siRNAs resultantes del procesamiento por DICER se incorporan a un complejo de proteínas denominado RISC (por sus siglas en inglés, RNA Induced Silencing Complex). En este complejo se separa la doble cadena, y solo una de las cadenas seguirá acoplada al complejo, la cual se denomina cadena guía. Esta cadena guía es complementaria al mRNA blanco con el que interaccionara formando la unión siRNA-mRNA que resulta en un corte del mRNA y su posterior degradación. Los siRNA exógenos también pueden dirigir silenciamiento de la transcripción de genes por la inducción de formación de heterocromatina, guiada por la metilación de histonas y/o deacetilación, y por la metilación del DNA. (31)(36)

Otra manera de generar experimentalmente RNA de interferencia endógenos es empleando vectores virales que produzcan shRNAs (por sus siglas en inglés, Short Hairpin RNA). El transcrito para el shRNA es sintetizado en los núcleos de las células, procesado y transportado al citoplasma, y finalmente procesado por el complejo RISC para desarrollar su actividad degradadora del mRNAs del gen de interés. (36)

Inhibición del HCV empleando iRNA

Gracias a su potencia y especificidad, el RNAi rápidamente se ha convertido en una herramienta poderosa de la investigación básica para analizar funciones de genes y su potencial en aplicaciones terapéuticas. Recientemente, se ha reportado la inhibición exitosa de varios patógenos humanos empleando RNAi, incluyendo el virus de inmunodeficiencia humana, poliovirus, virus de la influenza, virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), y virus de hepatitis B (HBV). (37)

Como el HCV es un virus de RNA que se replica en el citoplasma de los hepatocitos, es un candidato ideal para el tratamiento basado en el RNAi. Sin embargo, el alto grado de heterogeneidad de las secuencias virales ha sido un obstáculo especialmente importante para el desarrollo de antivirales

efectivos mediante metodología de RNAi. Una de las regiones más conservadas del genoma viral es la región 5'-NTR del HCV. (9)

En una de las primeras investigaciones empleando RNAi contra el HCV Yokota y colaboradores (35) diseñaron cinco siRNAs contra la región 5'-NTR. Los cuales fueron los siguientes:

1) siRNA 12:
5'-GCCCCCGAUUGGGGGCGACTT-3' (sentido),
3'-TTCGGGGGCUAACCCCGCUA-5' (antisentido).

2) siRNA 82:
5'-GCGUCUAGCCAUGGCGUUATT-3' (sentido),
3'-TTCGCAGAUCGGUACCGCAAU-5' (antisentido).

3) siRNA 189:
5'-GGACGACCGGGUCCUUCUTT-3' (sentido),
3'-TTCCUGCUGGCCAGGAAAGA-5' (antisentido).

4) siRNA 286:
5'-GGCCUUGUGGUACUGCCUGTT-3' (sentido),
3'-TTCCGGAACACCAUGACGGAC-5' (antisentido).

5) siRNA 331:
5'-GGUCUCGUAGACCGUGCACTT-3' (sentido),
3'-TTCCAGAGCAUCUGGCACGUG-5' (antisentido).

Se observó que el siRNA 331 fue el más efectivo con una inhibición del ~80% del replicón del virus, mientras que el siRNA 12 fue el menos efectivo pues incrementa la actividad del replicón.

En 2003 Seo y colaboradores (38) diseñaron cuatro siRNAs dúplex de 21pb que dirigieron contra diferentes regiones del 5'UTR del genoma del virus de la hepatitis C.

1) siRNA 5U5:
5'-GUACUGCCUGAUAGGGUGCUU-3' (sentido),
3'-UUCAUGACGGACUAUCCCACG-5' (antisentido).

2) siRNA GL2:
5'-CGUACGCGAAUACUUCGAUU-3' (sentido),
3'-UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5' (antisentido).

3) siRNA GL3:
5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAUU-3' (sentido),
3'-UUGAAUGCGACUCAUGAAGCU-5' (antisentido).

4) siRNA SIN:
5'-AUCUCUACGGUGGUCCUAAUU-3' (sentido),
3'-UUUAGAGAUGCCACCAGGAUU-5' (antisentido).

Transfectaron estos siRNA's en células 5-2, una línea derivada de células Huh-7 que alberga RNA subgenómico autónomo-replicante de HCV acoplado al gen de la luciferasa que refleja indirectamente los niveles de replicación del virus. Los niveles de replicación se redujeron hasta un 85% de forma dosis-dependiente empleando el siRNA 5U5 en comparación con los controles. También se analizó la posible toxicidad celular implicada con la transfección de estos siRNA's, pero los niveles de ATP en las células no mostraron cambios en las células transfectadas. El efecto de 5U5 en la replicación del RNA del HCV se corroboró mediante PCR cuantitativo mostrando una reducción similar a la observada con la medición por luciferasa.

Los resultados de Seo y sus colaboradores muestran que un siRNA de 21 pares de bases es capaz de inhibir el RNA del HCV en células de hígado humano, lo que implica que la célula tiene los componentes funcionales necesarios para ello. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el HCV interfiere con la capacidad de DICER para generar un siRNA endógeno o procesar shRNA exógeno. Por la persistencia de la infección el HCV puede haber desarrollado mecanismos para evadir la vía del siRNA. Sin embargo, la introducción de un siRNA dúplex preformado no requiere procesamiento por DICER lo que ayudaría al éxito del siRNA.

En el 2007 Sakamoto y colaboradores (39) investigaron los efectos de secuencias de RNA interferente in vivo. Utilizando vectores recombinantes de retrovirus y adenovirus que expresaron un shRNA dirigido a la región 5'UTR tanto en células Huh7 y Retro Pack PT67 que expresaban el replicón del HCV genotipo 1b como en ratones transgénicos CN2-29, los cuales son inducidos a expresar mRNA para las proteínas estructurales del HCV (genotipo 1b) por el sistema Cre/loxP, modelo experimental de infección por HCV (40).

Los shRNAs contruidos fueron los siguientes:

1) shRNA-HCV-19:
5'-GGTCTCGTAGACCGTGCAC-3' (sentido),
TTCAAGAGA (loop),

5'-GTGCACGGTCTACGAGACCTTTTT-3'
(antisentido).

2) shRNA-HCV-21:
5'- GGTCTCGTAGACCGTGCACCA-3' (sentido),
TTCAAGAGA (loop),
5'-TGGTGCACGGTCTACGAGACCTTTTT-3'
(antisentido).

3) shRNA-HCV-21m: 5'- GGTTCGTAGACTGTG-
TACCA-5' (sentido),
TTCAAGAGA (loop),
5'-TGGTGCACGGTCTACGAGACCTTTTT-3' (an-
tisentido).

4) shRNA-HCV-27:
5'-GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATG-3'
(sentido).
TTCAAGAGA (loop),
5'-CATAGTACACGATCTACGAAACCTCCCTTTTT
-3' (antisentido).

5) shRNA-HCV-27m:
5'-GGGAGGTTTCGTAGACTGTGTACTATG-3'
(sentido),
TTCAAGAGA (loop),
5'-CATGGTGCACGGTCTACGAGACCTCCCTTT-
TT -3' (antisentido).

6)shRNA-Control-27m:
5' -GCAGCAGTAGCAGTGGGATCTATTAGG-3'(sentido),
TTCAAGAGA (loop),
3'-CCTGATAGGTCCCGCTGCTGCTGCTGCTTT-
TT-5' (antisentido).

La transducción retroviral del shRNA en células Huh7 provocó resistencia a la subsecuente transfección del replicón de HCV el cual fue incapaz de replicarse. Cuando las Huh7 que expresan el replicón del HCV fueron transducidas con un adenovirus que expresaba el shRNA suprimió la replicación en un rango de 103. Demostrándose una función protectora y terapéutica al emplear estas secuencias. Por otro lado, la administración sistémica del adenovirus que expresa el shRNA en el modelo de ratones transgénicos CN2-29 resultó en una supresión de la síntesis de proteínas del HCV en el hígado, lo que demuestra la efectividad y viabilidad del sistema de expresión del iRNA in vivo.

El empleo de siRNA puede inducir mutaciones en el genoma del HCV que confieren resistencia

Joyce A. Wilson y colaboradores (45) mostraron que un siRNA contra la región 5'UTR bloquea la expresión de genes y la síntesis de RNA del HCV evitando la propagación de éste en las células del hígado humano. Sin embargo, en su estudio mostraron que este bloqueo es incompleto ya que como consecuencia de los tratamientos con siRNA el replicón genera resistencia a los tratamientos posteriores con el mismo siRNA. Las secuencias de los replicones siRNA-resistentes presentaron mutaciones puntuales en la secuencia diana del siRNA. No obstante, el replicón es nuevamente sensible al tratamiento con siRNA si este es dirigido a una región diferente del genoma (42). Esto sugiere que el uso de múltiples siRNAs podría prevenir la aparición de virus/replicones resistentes.

Por otro lado, en el 2007 Teresa I. Ng. y colaboradores (28) seleccionaron un siRNA dirigiéndolo a una colección de cerca de 4,000 genes humanos en células Huh7 que contienen una activa replicación del replicón subgenómico del HCV con el fin de identificar los genes hospederos importantes en la replicación del virus. Los cuales sobresalieron TBXA2R (receptor de la proteína G), RelA y NFB2 (factores de transcripción), MKK7 y SNARK (proteína quinasas), SLC12A4 y SLC12A5 (proteínas transportadoras). Algunos de estos genes (TBXA2R, SLC12A4 y SLC12A5) inhibieron la replicación del HCV en un 90%. La identificación de estos genes es una gran estrategia para emplear como posible terapia en la inhibición de la replicación del HCV.

Duckhyang Shin y colaboradores (43) en el 2009, emplearon un sistema de expresión de iRNA para inhibir la replicación del virus de la hepatitis C genotipo 1b usando dos promotores convergentes RNA polimerasa III, U6 y H1 humano, para producir un RNA dúplex linear que tiene una estructura secundaria similar y extender las moléculas sintéticas del siRNA. Esto dirigido a silenciar los genes de las proteínas virales E2 y NS3. Los resultados mostraron que el silenciamiento de los genes más efectivo y específico de secuencia se puede lograr cuando las unidades siRNA se componen de 21 + 21 nt o 23 + 21 nt, inhibiendo la replicación del virus hasta en un 59%. Parece que la actividad no está afectada

significativamente por invertir la orientación de las secuencias de siRNA. Este enfoque proporcionará una plataforma útil para el diseño de precursores extendidos de siRNAs silenciando la expresión de genes de manera efectiva.

Inhibición del HBV empleando iRNA

La infección viral por hepatitis B actualmente sigue siendo un reto para la medicina moderna. El RNA de interferencia puede ser una herramienta útil para combatir esta enfermedad y revolucionar los tratamientos actuales.

Uno de los trabajos mas significativos donde se empleó el uso de un RNA de interferencia contra el HBV se realizo en el 2003 por McCaffrey y colaboradores. Ellos bloquearon la replicación del virus de la hepatitis B en cultivo celular y en ratones inmunocompetentes e inmunodeficientes, transfectados con el plásmido que contiene el shRNA contra el HBV. Construyeron 7 shRNAs y un control introducidos en el plásmidos (pTHBV2):

HBVU6no.1,
5'-TCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC-3'

HBVU6no.2,
5'-CTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTC-3'

HBVU6no.3,
5'-ATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTC-3'

HBVU6no.4,
5'-TGGCCAAAATTCGCAGTCCCAACC-3'

HBVU6no.5,
5'-TCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGC-3'

HBVU6no.6,
5'-CCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTC-3'

HBVU6no.7,
5'-AGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTC-3'

Control negativo RNAi,
5'-TGGATATGCACGGTGTGACTGATT-3'

Entre los órganos transfectados con el DNA de HBV (hígado, bazo, riñón y páncreas) en hígado se ex-

preso el gen un 40% en sus niveles mas altos. McCaffrey y su equipo demostraron que significativamente se redujo la expresión del mRNA y proteína viral, con esto inhibieron la replicación del virus en los hepatocitos. (44)

En 2004 el equipo de Hui-Lin Wu dirigieron un shRNA contra el HBV genotipo A, B y C en la región mas conservada del virus, esto expresado en un plásmido (pSuper/HBVS1) que se cotransfecto en células Huh-7 y en ratones. Evaluaron los niveles de proteína y mRNA viral en células y ratones, los cuales disminuyeron significativamente al administrar el shRNA a células y modelos experimentales infectados con el virus de los 3 genotipos. Con esto concluyen que el shRNA es una herramienta potencial para disminuir y bloquear la replicación del virus de la hepatitis B para los genotipos A, B y C. Sin embargo, pueden surgir mutaciones del HBV que deben considerarse. (45)

En 2005 Ren y colaboradores usaron un promotor citomagalovirus (CMV) modificado para dirigir la expresión del shRNA contra el HBV, con la polimerasa II (Pol II), la cual es considerada un fuerte promotor. El equipo de trabajo de Ren construyó siete vectores expresando shRNA específicos dirigidos por el promotor RNA Pol II y transfectados en células Hep2.2.15. Los análisis de PCR y western blot realizados mostraron que el mRNA viral fue significativamente degradado. (46)

En 2007 Gui Qiu Li y colaboradores combinaron un RNA de interferencia con Lamivudina para inhibir la replicación del HBV en células HepG2.2.15. Esto en un plásmido recombinante (Phil-HBV). Los niveles de mRNA del HBV se examinaron por RT-PCR, los cuales demostraron que el uso de siRNA combinado con la lamivudina lograron una reducción del 80.56% a las 96 hrs comparado con el siRNA y lamivudina administrados por separado. (47)

Estrategias antifibrogenicas empleando iRNA en hígado y otros órganos

En el 2005 Meeyul Hwang y colaboradores diseñaron un shRNA para suprimir los niveles de TGF- β 1 transcripcionales y transicionales en cultivo primario de células mesangiales de rata in Vitro y en fibrosis inducida en riñón de ratón in Vivo, acompañado

por la supresión de los genes diana (colágena tipo I y PAI-1) de TGF- β 1.

Diseñaron cuatro shRNAs contra TGF- β 1, las cuales fueron:

- 1) 5'-cggaattcAAGTCAACTGTGGAGCAACACTTTTgatatctagaca-3' (sentido), ttcaagaga GTGTTGCTCCACAGTTGACTT (antisentido), shTB1ay (vector).
- 2) 5'-cggaattcGCTCGCTTTGTACAACAGCACTTTTgatatctcgaca-3' (sentido), ttcaagaga GTGCTGTTGTACAAAGCGAGC (antisentido), shtb1B (vector).
- 3) 5'-cggaattcGACCGCAACAACGCAATCTATTTTTTgatatctagaca-3' (sentido), ttcaagaga ATAGATTGCGTTGTTGCGGTC (antisentido), shTB1c (vector).
- 4) 5'-cggaattcAACCAAGGAGACGGAATACAGTTTTTgatatctagaca-3' (sentido), ttcaagaga CTGTATTCGTCTCCTTGGTT (antisentido), shTB1d (vector).

Con esto evaluaron su actividad en cultivo primario de células mesangiales de rata y en riñón de ratones machos ICR con obstrucción ureteral unilateral (UO por sus siglas en ingles Unilateral Ureteral Obstruction). Se hicieron 3 grupos, 1) Ratones con obstrucción ureteral unilateral sin tratamiento, 2) Ratones tratados con un vector vacío, 3) Ratones tratados con el vector shTB1d. Se indujo UO mediante ligación de la uretra izquierda con hilo de seda 4-0 a través de una incisión lateral. En sus resultados encontraron que el shRNA (shTB1d) contra TGF- β 1 suprimió la expresión de TGF- β 1, colágena tipo I y PAI-1 en cultivo primario de células mesangiales así como en el riñón de ratón con UO. Concluyendo así que el desarrollo de la fibrosis tubulointerstitial fue significativamente destruida después de la administración del shRNA (shTB1d).(48)

Mas tarde, J. George y M. Tsutsumi estudiaron la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF por sus siglas en ingles) en cultivo primario de células estelares hepáticas obtenidas de ratas albinas Wistar de 2 meses de edad usando inmunohistoquímicas marcadas con α -SMA y CTGF, después indujeron fibrosis hepática en ratas mediante inyecciones de N-nitrosodimetilamina (NDMA) y estudiaron la sobre-regulación de TGF- β 1 y CTGF

durante el proceso de fibrogenesis hepática y por ultimo disminuyeron la expresión de CTFG usando un siRNA contra CTFG y así examinar el papel que juega este CTGF siRNA para prevenir la progresión de fibrosis hepática por DNMA inducido. Para la construcción del siRNA se selecciono la secuencia diana para CTGF comenzando en el nucleótido 890 (NM_022266), 5' -CAA UAC CUU CUG CAG GCU GGAtt-3' (sentido) y 3'-ttGUU AUG GAA GAC GUC CGA CCU-5' (antisentido). El loop seleccionado fue 5' -TTG ATA TCC G-3'. El oligo de doble cadena fue ligado dentro de un vector de expresión de siRNA (pRNA-CMV3.1/Neo) entre los sitios de BamHI y Hindi. Guiando la expresión de CTGF siRNA por el promotor de citomegalovirus (CMV).

Los resultados obtenidos mostraron que después de la administración de NDMA durante 7 y 14 días activan las células estelares hepáticas sobre-regulando CTGF y TGF- β 1, ambos en el mRNA y en niveles de proteína así como en la fibrosis hepática bien desarrollada. Los estudios de inmunomarcaje, western blot, RT-PCR y PCR semicuantitativa mostraron que la expresión de CTGF y TGF- β 1 disminuyeron después del tratamiento con CTGF siRNA, esto en comparación contra los grupos control. Lo cual demostró que el silenciamiento del gen para CTGF mediante un siRNA reduce la sobre expresión de los genes CTGF y TGF- β 1 e inhibe la acumulación de proteínas del tejido conectivo en el hígado. J. George y M. Tsutsumi sugieren que el siRNA es una aplicación terapeutica potencial para fibrosis hepática.(49)

Kun Cheng y colaboradores construyeron diez siRNAs dirigidos a diferentes regiones del mRNA de TGF-b1 y probar que tanto suprimen la expresión del gen para después convertir los siRNAs mas efectivos en shRNA, esto en celulas de rata HSC-T6 (Immortalized rat hepatic stellate cells).

- 1) siRNA-297 GCCAGATCCTGTCCAAACT
- 2) siRNA-448 GGACTACTACGCCAAAGAA
- 3) siRNA-499 CGCAATCTATGACAAAACC
- 4) siRNA-640 GCAACACGTAGAACTCTAC
- 5) siRNA-769 GAACCAAGGAGACGGAATA

- 6) siRNA-888 GCACCATCCATGACATGAA
- 7) siRNA-1033 GCAGCTGTACATTGACTTT
- 8) siRNA-1036 GCTGTACATTGACTTTAGG
- 9) siRNA-1167 CCCTCTACAACCAACACAA
- 10) siRNA-1245 TCTACTACGTGGGTCGCAA

Los siRNAs mas efectivos fueron el siRNA-1036 con un 70% de silenciamiento, siRNA-1033 con 55% y siRNA-769 con 35%, causando una inhibición significativa de la expresión de TGF- β 1, también observaron que combinando los siRNA-769 y siRNA-1033 se inhibía la expresión de TGF- β 1 en mas porcentaje que utilizando un solo siRNA. Inhibiendo TGF- β 1 también contribuye a que se induzca la supresión de TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) lo cual potencializa el efecto protector anti-profibrogénico del hígado.

Se seleccionaron dos siRNAs para convertirlos a shRNAs los cuales fueron siRNA-1033 y siRNA-769 que contenían un único sitio de restricción en el 5' y 3' para la clonación y un tramo TTTTTT en la cadena antisentido para crear una señal terminal pol III y otro tramo TTCAAGAGA como un loop.

1) Control shRNA

Antisentido:

5'-ACTTCATAAGGCGCATGCTTTCAAGAGAAG-CATGCGCCTTATGAAGTTTTTTT-3'

Sentido:

5'-AATTAAAAAACTTCATAAGGCGCATGCTTCTCTTGAAAGCATGCGCCTTATGAAGTGCC-3'

2) shRNA-769

Antisentido:

5'-GAACCAAGGAGACGGAATATTCAAGAGATA-TTCGTCTCCTTGTTCTTTTTT-3'

Sentido:

5'-AATTAAAAAGAACCAAGGAGACGGAA-TATCTCTTGAATATTCCGTCTCCTTGTTTCG-GCC-3'

3) shRNA-1033

Antisentido:

5'-GCAGCTGTACATTGACTTTTTCAAGA-GAAAAGTCAATGTACAGCTGCTTTTTT-3

Sentido:

5'-AATTA AAAAAGCAGCTGTACATTGACTT-TTCTCTTGAAAAGTCAATGTACAGCTGCG-GCC-3'

Comparando los siRNA contra los shRNA, se observó que con ambos se obtuvo un silenciamiento significativo de TGF- β 1 siendo el shRNA el que más porcentaje de silenciamiento generó, mostrando así la supresión mayor a las 48 horas después de la transfección. Los autores concluyen que el shRNA obtuvo mayores resultados silenciando el gen de TGF- β 1 y con esto contribuyendo a la reducción de la producción de colágeno tipo I, TIMP-1 y citocinas inflamatorias haciendo mas eficiente la terapia contra la fibrosis hepática.(50)

Conclusión

El RNA de interferencia es una herramienta que nos proporciona nuevas alternativas para combatir las variadas enfermedades hepáticas relacionadas con cirrosis, principalmente el virus de la hepatitis C que es una enfermedad de gran impacto en el mundo, ya que origina otras enfermedades que conllevan a la muerte, el encontrar nuevas terapias o formular nuevos fármacos no es una tarea fácil de realizar, ya que se requiere del estudio profundo del genoma viral para así poder combatir eficazmente esta enfermedad. En los estudios que se han realizado todos coinciden en que el punto clave para inhibir la replicación del virus tanto en HCV como el HBV, es dirigiendo el iRNA contra diferentes puntos de las regiones conservadas del genoma viral, esto para prevenir que si alguna mutación se produce en la región no conservada el RNA de interferencia nos sea inefectivo. Otros estudios utilizan este iRNA contra agentes profibrogenicos evitando el desarrollo de la fibrosis hasta en un 70%. El descubrimiento de RNAs de interferencia ha sido un gran paso en la búsqueda de soluciones para combatir estos virus pues nos ha proporcionado nuevas vías de tratamiento. El diseño de siRNAs es una herramienta muy prometedora no solo para el tratamiento de esta enfermedad sino para muchas

otras aplicaciones y enfermedades, cada día hay mas y mas estudios sobre este sistema innovador de terapia génica aunque aun hace falta su completo y amplio desarrollo para llevarlo a cabo en estudios con pacientes.

Desde su descubrimiento accidental, el RNA de interferencia ha demostrado su enorme potencial, lo que se refleja en el creciente número de artículos científicos que la refieren como estrategia experimental. Una búsqueda sencilla en el principal buscador de artículos científicos (el PubMed del national Center for Biotechnology Information) arroja más de diez mil referencias bibliográficas. Estas estadísticas nos dan una idea de la importancia que a cobrado esta herramienta, comparable con otras metodologías igualmente potentes como lo fue el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (31).

Por todo esto y su gran potencial se espera que el RNA de interferencia tenga aplicaciones clínicas en la próxima década siendo esta una terapia mucho mas especifica que las ya existentes y con mejores resultados ya sea mejorando la calidad de vida o incluso hasta acabar con la enfermedad.

Referencias

- 1- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR, New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. Toxicologic Pathology 2005; 33:27-34.
- 2- Base de Mortalidad INEGI-SSA. 2003.
- 3- Sistema Nacional de Información en Salud 2008.
- 4- Gershwin M. Eric et al, Liver Immunology , Hanley & Belfus 2003;142-155
- 5- Ping-Fang Hu Et Al, Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 expression by siRNA in rat hepatic stellate cells. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2008; 23: 1917-1925
- 7- A. Mesejo, M. Juan y A. Serrano. Cirrosis y encefalopatía hepáticas: consecuencias clínicometabólicas y soporte nutricional. Nutr Hosp. 2008;23(Supl. 2):8-18 Madrid, España.

- 8- World Health Organization. Hepatitis A vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75:38-44.
- 9- Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis surveillance report no. 60. 2005
- 10- A. M. Evens et al. Rituximab-associated hepatitis B virus (HBV) reactivation in lymphoproliferative diseases: meta-analysis and examination of FDA safety reports *Ann. Onc.* 2010 : mdq583v1-mdq583.
- 11- Congwen et al. Antiviral Signaling Protein Immunity by Downregulating Mitochondrial The Hepatitis B Virus X Protein Disrupts Innate. *J Immunol*; 2010; 185: 1158-1168.
- 12- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26:62S-65S
- 13- Takanori Yokota Et Al, Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs, *EMBO reports* 2003; 4: 602-608
- 14- Pawlotsky JM. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 45-66.
- 15- Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85: 3173-3188.
- 16- Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: S132-S135.
- 17- P. Arbutnot; V. Longshaw; T. Naidoo; M. S. Weinberg, Opportunities for Treating Chronic Hepatitis B and C Virus Infection Using RNA Interference, *J Viral Hepat.* 2007;14(7):447-459
- 18- Akito Sakai Et Al, The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *PNAS* 2003;100(20):11646-11651
- 19- Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005; 79: 9369-9380.
- 20- Xu Z, Choi J, Yen TS et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J* 2001; 20: 3840-3848.
- 21- Li K, Foy E, Ferreon JC et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2992-2997.
- 22- Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumter, R., Ikeda, M., Lemon, S. M. & Gale, M., Jr. Regulation of Interferon Regulatory Factor-3 by the Hepatitis C Virus Serine Protease. *Science* 2003; 300, 1145-1148.
- 23- Bigger CB, Brasky KM, Lanford RE. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001; 75: 7059-7066.
- 24- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140: 346-55.
- 25- Naoya Sakamoto Et Al, Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008; 23: 1437-1447
- 26- Chander, G. Et Al., Treatment of chronic hepatitis C: A systematic review. *Hepatology* 2002; 36: S135-S144.
- 27- Paul J. Pockros, MD. The Management of Adverse Effects with PEG-Interferon/Ribavirin Combination Therapy is a Significant Challenge. The HCV Advocate Medical Writers' Circle. The Hepatitis C Support Project. 2003; 1-2.
- 28- Teresa I. Ng Et Al., Identification of Host Genes Involved in Hepatitis C Virus Replication by Small Interfering RNA Technology, *HEPATOLOGY* 2007;45:1413-1421.
- 29- Radhakrishnan SK, Layden TJ, Gartel AL., RNA interference as a new strategy against viral hepatitis, *Virology* 2004; 323: 173-181

- 30- Jiehua Zhou, John J. Rossi, Aptamer-Targeted cell-specific RNA interference, *Silence*, 2010 1:4
- 31- Tomás López, Daniela Silva, Susana López y Carlos Arias, RNA de interferencia: el silencio de los genes, *Biotecnología*, 2007; 14:109-118
- 32- Ernie Hood, RNAi: What's All the Noise About Gene Silencing?, *Environmental Health Perspectives*. 2004;112
- 33- Dirk Grimm, Small silencing RNAs: state-of-the-art, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009; 61: 672-703
- 34- Monica R. Lares, John J. Rossi, Dominique L. Ouellet, RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications, *Trend Biotechnology* 2010; 20: 1-10
- 35- Yokota T, Et Al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003; 4: 602-608.
- 36- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J, siRNA vs. shRNA: Similarities and differences, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 746-759
- 37- Naoya Sakamoto Et Al, inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2008; 23: 1437-1447.
- 38- Seo, M.Y., Abrignani, S., Houghton, M. & Han, J.H. Letter to the editor. Small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *J.Virol.* 2003; 77, 810-812.
- 39- Sakamoto N et. al., Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterol Hepatol* 2008, 9:1437-47.
- 40- Wakita T, Taya C, Katsume A et al. Efficient conditional transgenes expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 9001-6.
- 41- Wilson JA, Richardson CD., Hepatitis C Virus Replicons Escape RNA Interference Induced by a Short Interfering RNA Directed against the NS5b Coding Region, *Journal of Virology*, June 2005; 79(11) 7050-7058.
- 42- Kronke, J., R. Kittler, F. Buchholz, M. P. Win-disch, T. Pietschmann, R. Bartenschlager, and M. Frese. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J. Virol.* 2004; 78:3436-3446.
- 43- Duckhyang Shin, Hyeon Lee, Soo In Kim, Yeup Yoon and , Meehyein Kim., Optimization of linear double-stranded RNA for the production of multiple siRNAs targeting hepatitis C virus, *RNA* 2009; 15: 898-910
- 44- A. P. McCaffrey, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21(6):639-644.
- 45- H. L. Wu, et al. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* 2005; 128(3):708-716.
- 46- G. L. Ren, et al. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication by expressed siRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 335(4):1051-1059.
- 47- G. Q. Li, et al. Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2.2.15 cells. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(16):2324-2327.
- 48- Meeyul Hwang et. al. TGF- β 1 siRNA suppresses the tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction. *Experimental and Molecular Pathology* 2006; 81, 48-54.
- 49- J George y M Tsutsumi. siRNA-mediated knock-down of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Therapy* 2007 14, 790-803.
- 50- Kun Cheng, Ningning Yang y Ram I. Mahato. TGF- β 1 Gene Silencing for Treating Liver Fibrosis. *Mol Pharm.* 2009 ; 6(3): 772-779.