

ARN interferente y Micro ARN: una estrategia de silenciamiento del Virus de la Inmunodeficiencia Humana

RNA interference and microRNA: A strategy of silencing for the human immunodeficiency virus

Y. Vladimir Pabón-Martínez^{1,2}

Palabras clave: ARN interferente, micro ARN, Virus de la Inmunodeficiencia Humana, siARN, shARN, shARNmir

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), es un lentivirus del grupo de los retrovirus y es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Los lentivirus, como el VIH causan sub-infecciones clínicas con una viremia persistente, respuesta neutralizante débil de anticuerpos y una continua mutación del virus. La infección por el VIH es una pandemia en crecimiento, especialmente en países pobres o en vías de desarrollo. Se estima que en el mundo existen ~3.3 millones de personas (31.4 – 35.3 millones) infectadas con el virus. Sin embargo, a pesar del conocimiento que se tiene del virus, aún no ha sido posible obtener una cura o vacuna definitiva.

La terapia génica brinda la promesa de prevenir la progresión de la infección por el VIH mediante la interferencia sustancial que conlleve a la disminución de la replicación viral en ausencia de quimioterapia crónica. Además, tiene el potencial de complementar las terapias antirretrovirales convencionales y aumentar los efectos de las tecnologías actualmente disponibles en pro de la disminución de la infección. Actualmente, al día de hoy de acuerdo al “Journal of Gene Medicine” existen 138 ensayos clínicos en terapia génica para el tratamiento de enfermedades infecciosas incluida la infección por el VIH. Existen diferentes aproximaciones que han sido utilizadas en terapia génica en contra del VIH, las cuales se agrupan en dos categorías, (i) Agentes basados en ARN: antisentido, ribosimas,

1. Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), Bucaramanga (Colombia), Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud, Laboratorio Central de Investigaciones.

2. Unit of Molecular Cell Biology and Gene Therapy Science, Estocolmo (Suecia), Clinical Research Center at Novum, Department of Laboratory Medicine Karolinska University Hospital.

Correspondencia: Y. Vladimir Pabón-Martínez, Bact, MSc (c) en Ciencias Básicas Biomédicas. Investigador GIEM, Dirección: Carrera 32 # 29-31- Laboratorio Central de Investigaciones, Teléfono: 6344000 extensión 3130, e-mail: yavlapm@yahoo.es

Resúmenes del congreso

aptámeros y ARN interferente (ARNi), y (ii) Agentes basados en proteínas: proteínas negativas dominantes, inhibidores de fusión y nucleasas de dedos de zinc.

El VIH fue uno de los primeros agentes infecciosos contra los cuales se empleó ARNi debido al amplio conocimiento que se tiene de las características del virus, el ciclo de vida y los patrones de expresión de los genes del virus. El ARNi es un mecanismo de silenciamiento génico celular natural, altamente conservado en respuesta a ARN de doble hebra, que actúa a nivel pos-transcripcional mediante la degradación específica de ARNm homólogo. Los tres principales modelos de liberación usados para ARNi en células mamíferas han sido: (i) ARN interferentes pequeños (siARN, del inglés small interfering RNA) sintetizados químicamente, (ii) ARN cortos en forma de pinza (shARNs, del inglés short hairpin RNA) clonados en plásmidos vectores de ADN y (iii) micro ARNs (miARNs, del inglés micro RNA) adaptados para shARN clonados en plásmidos vectores de ADN (shARNmir).

Objetivo

Dar a conocer algunos de los diferentes modelos de liberación usados para ARNi con el propósito de inhibir blancos estratégicos en el VIH.

METODOLOGÍA

La metodología utilizada en el diseño y evaluación de secuencias de ARNi puede abordar el siguiente orden: (i) Selección de blancos estratégicos, en la mayoría de los casos previamente reportados como secuencias consenso, secuencias altamente conservadas e indispensables para la supervivencia del virus o con funciones importantes de interacción. (ii) Diseño de secuencias de ARNi, las secuencias pueden ser diseñadas manualmente o por medio de software especializados de acceso gratuito en la red. (iii) Clonación de las secuencias en plásmidos vectores de expresión, por métodos de clonación tradicional o por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (iv) Evaluación de la inhibición, cotransfección de cultivos celulares con el vector de expresión y con un plásmido portador de un gen reportero, esto con el propósito

de permitir la liberación de los ARN interferentes y poder determinar la inhibición de la expresión de las regiones blanco. (v) Microscopia de fluorescencia, con el propósito de evidenciar empíricamente la cotransfección, especialmente cuando son usados plásmidos con marcadores de selección de genes reporteros fluorescentes. (vi) Citometría de Flujo, para verificar y cuantificar el porcentaje de inhibición. (vii) Inmunofluorescencia, con el propósito de determinar la inhibición de las proteínas. Finalmente, (viii) PCR en tiempo real, para cuantificar el nivel de inhibición de las secuencias de ARNi.

DISCUSIÓN

Los modelos de liberación usados para ARNi en células mamíferas, siARN, shARN y shARNmir presentan similitudes y diferencias. Los siARN son ARN cortos de doble hebra de 19-22 nucleótidos de longitud, con dos nucleótidos colgantes en los extremos, un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Fueron las primeras moléculas sintetizadas utilizadas en células que causan silenciamiento transitorio y variada eficiencia de transfección en diferentes líneas celulares. Los shARN son modelados en precursores de miARNs (pre-miARNs) y clonados en vectores virales, éstos son producidos como moléculas de hebra sencilla de 50-70 nucleótidos de longitud y forman una estructura tallo-asa; la cual es clivada por Dicer e incorporada en RISC como un siARN. Los shARNmir son expresados como transcritos de miARN primarios (pri-miARN), fueron rediseñados usando el miARN humano miR-30 y permiten la expresión de un siARN/miARN artificial, debido a que el tallo del miR-30 es reemplazado con un dúplex de ARN dirigido contra blancos específicos; este diseño no afecta la maduración normal del miR-30 y permite el procesamiento endógeno de los miARNs para producir siARNs maduros.

Algunos autores describen una diferencia de inhibición de ~12 veces mayor de las secuencias de shARNmir comparadas con los siARN, lo cual podría ser explicado debido a que el diseño de los shARNmir endógenos entran antes que los shARN o siARN a la vía del ARNi

Resúmenes del congreso

y son procesados por Dicer y Drosha como un miARN endógeno, produciendo más siARNs disponibles para la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés RNA-induced silencing Complex) y por ende para el silenciamiento del ARNm blanco. Otra ventaja de los shARNmir es que permiten una transfección transitoria mayor de 3 a 5 días y no presentan problemas de toxicidad ya que son procesados como un miARN endógeno.

Sin embargo, la característica común del ARNi y todas las vías de silenciamiento mediado por ARN pequeños, tanto siARN, shARN y shARN, es la asociación de la hebra de ARN guía con una proteína de la familia Argonauta; así como la incorporación de los dúplex de ARN en el RISC, lo cual requiere de una característica estructural, la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' y de dos nucleótidos colgantes en el extremo 3'. Estas características en común permiten el diseño de diferentes estrategias de liberación que usen o combinen la vía del ARNi o la vía de generación de los miARN.

En nuestro grupo hemos diseñado y evaluado diferentes secuencias de siARN contra diferentes blancos del VIH-1, entre ellas, el co-receptor CCR5 y los genes *rev* y *nef* del VIH. Actualmente estamos trabajando con el modelo de ARNi basado en miARN y shARNmir con el propósito de comparar el grado de inhibición de nuestras secuencias diseñadas en forma de siARN, como un shARNmir.

CONCLUSIÓN

La terapia génica permite el desarrollo de nuevas y diferentes estrategias terapéuticas contra la infección causada por el VIH. Una de estas estrategias terapéuticas hace uso de la tecnología del ARNi, permitiendo la degradación o la represión de la traducción del ARNm codificante para proteínas del virus, en procura de su inhibición, disminuyendo la replicación y la supervivencia del virus.

REFERENCIAS

1. Arteaga HJ, Hinkula J, van Dijk-Hard I, et al. Choosing CCR5 or Rev siRNA in HIV-1. *Nat Biotechnol* 2003; 21(3): 230-231.
2. Fewell GD, Schmitt K. Vector-based RNAi approaches for stable, inducible and genome-wide screens. *Drug Discov Today* 2006; 11(21-22): 975-982.
3. Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125(5): 887-901.
4. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418(6894): 244-251.
5. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115(2): 209-216.
6. Rossi JJ, June CH, Kohn DB. Genetic therapies against HIV. *Nat Biotechnol* 2007; 25(12): 1444-1254.