

# Modificaciones Químicas en ARN interferente: De la investigación básica a las aplicaciones terapéuticas

Álvaro Somoza

**Resumen:** En este artículo se introduce el campo del ARN interferente, tratando su origen, mecanismo, así como el papel que juega la química en este potente sistema de regulación de la expresión génica. En este sentido, se comentan diversas modificaciones químicas empleadas tanto para el estudio del mecanismo como para mejorar sus propiedades como agente terapéutico. Finalmente, se comentará el uso de modificaciones químicas en la obtención de información estructural del complejo proteico involucrado.

**Palabras clave:** ARN, ARN interferente, regulación génica, oligonucleótido.

**Abstract:** In this paper the topic of RNA interference is introduced describing its origin, mechanism and the role of chemistry in this potent gene regulatory system. In this sense, the use of different chemical modifications is presented focusing on the mechanism studies and in the development of a new therapeutic tool. Finally, the use of chemical modifications to get structural information of the protein complex involved is also addressed.

**Keywords:** RNA, RNA interference, gene regulation, oligonucleotide.

## Introducción

Desde la publicación por Andrew Fire, Craig Mello y colaboradores en *Nature* en 1998 del trabajo que supuso el punto de partida del ARN interferente han pasado tan solo 12 años.<sup>[1]</sup> En este breve espacio de tiempo esta contribución ha dado lugar a técnicas que se utilizan en la mayoría de laboratorios de biomedicina, miles de artículos científicos y decenas de empresas se han embarcado en el desarrollo de terapias basadas en este descubrimiento. El impacto del trabajo de Fire y Mello en la ciencia ha sido enorme y por sus contribuciones en el campo del ARN interferente fueron galardonados con el premio nobel en Medicina y Fisiología en el año 2006 (¡sólo ocho años después de la publicación de su trabajo!).

Pero, ¿qué es el ARN interferente? y ¿cuál es su relación con la química?. El ARN interferente es un proceso biológico, por lo que puede resultar llamativo ver un artículo de este campo publicado en una revista química. Sin embargo, en el ARN interferente la química ha jugado y juega un papel fundamental, ya que a través de las modificaciones químicas introducidas en el ARN ha sido posible dilucidar etapas clave del mecanismo de este proceso biológico, así como modular

las características del ARN para facilitar el desarrollo de terapias basadas en esta tecnología.

El objetivo de este artículo es introducir el fascinante tema del ARN interferente explicando tanto su modo de acción como el uso de modificaciones químicas que han facilitado su estudio y el desarrollo de un producto terapéutico fiable. Finalmente se discutirá el uso de ARN modificado en la obtención de información estructural de las proteínas involucradas en el proceso de inhibición de la expresión génica y cómo esta información podría ser útil a la hora de diseñar los fragmentos de ARN necesarios para conseguir una mejor actividad.

## ARN interferente

El ARN interferente es un proceso biológico que da lugar a la inhibición de la expresión de un determinado gen y que, sorprendentemente, se realiza con una eficacia y selectividad extraordinarias. Según el dogma central de la biología molecular, la información codificada en nuestros genes se transcribe a una cadena de ARN mensajero que es traducido a la proteína final correspondiente (Esquema 1). De esta forma, al inhibir la expresión de un gen se bloquea la producción de la proteína final. En el caso del ARN interferente, la inhibición génica tiene lugar mediante la degradación selectiva del ARN mensajero que, como consecuencia, no podrá ser traducido a la correspondiente proteína.

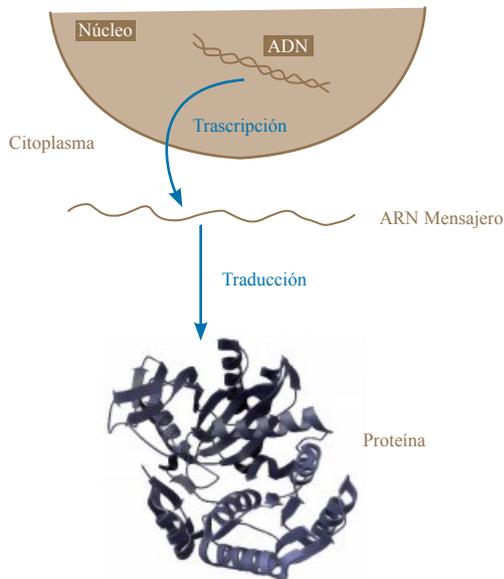
Como puede entenderse, este proceso puede tener una repercusión enorme en el funcionamiento de un ser vivo, ya que bloquea completamente la formación de las proteínas seleccionadas. Resulta sorprendente que un proceso tan potente no se haya detectado hasta hace prácticamente 12 años. En realidad, el establecimiento de las bases del ARN interferente ha permitido comprender resultados obtenidos muchos años antes, por ejemplo, un caso documentado a principios del siglo XX en la planta de tabaco.<sup>[2]</sup> De hecho fue en plantas donde empezaron a observarse procesos de inhibición génica, que han pasado a denominarse silenciamiento génico post-transcripcional.<sup>[3]</sup> En este sentido, el caso más interesante es el descrito en 1991 por Jorgensen, quien intentaba obtener



Á. Somoza

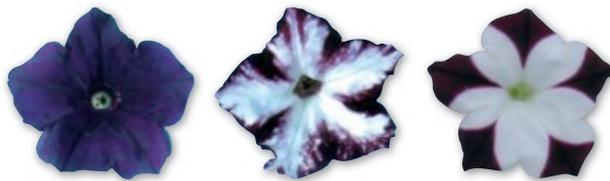
IMDEA-Nanociencia  
28049, Madrid  
C-e: [alvaro.somoza@imdea.org](mailto:alvaro.somoza@imdea.org)

Recibido: 15/04/2010. Aceptado 16/06/2010



**Esquema 1.** Representación del dogma de la biología molecular.

petunias con flores más coloreadas mediante la introducción de copias adicionales del gen de la chalcona sintasa.<sup>[4]</sup> Lo que obtuvo, sin embargo, fueron flores con menor proporción del pigmento que da lugar al color, e incluso flores blancas (Figura 1). En este caso, en lugar de aumentar la producción del gen deseado se estaba inhibiendo.



**Figura 1.** Flores de petunias. Izquierda: flor sin modificar. Centro y derecha: flores modificadas con genes que inhiben la formación de pigmentos coloreados.<sup>[5]</sup>

Durante esos años se llevaron a cabo varios estudios relacionados con este fenómeno de silenciamiento post-transcripcional en plantas,<sup>[6]</sup> conocido como co-supresión, e incluso en hongos donde se ha denominado *quelling*,<sup>[7]</sup> Fue en este ambiente, y con la experiencia previa<sup>[8]</sup> del uso de una cadena de ARN en la inhibición génica<sup>[9]</sup> (terapia antisentido), donde Fire y Mello realizaron su trabajo utilizando dobles cadenas de ARN con el fin de evaluar la capacidad de una estructura de doble cadena frente a cadenas simples en la inhibición génica. Para ello utilizaron un organismo que les había dado muy buen resultado previamente, el *Caenorhabditis elegans* (Figura 2).<sup>[1]</sup>



**Figura 2.** *Caenorhabditis elegans*.<sup>[10]</sup>

Este gusano transparente es un modelo ideal para el estudio de seres vivos pluricelulares, ya que se compone tan sólo de unas 1000 células y es capaz de realizar las mismas funciones que organismos mucho más complejos.

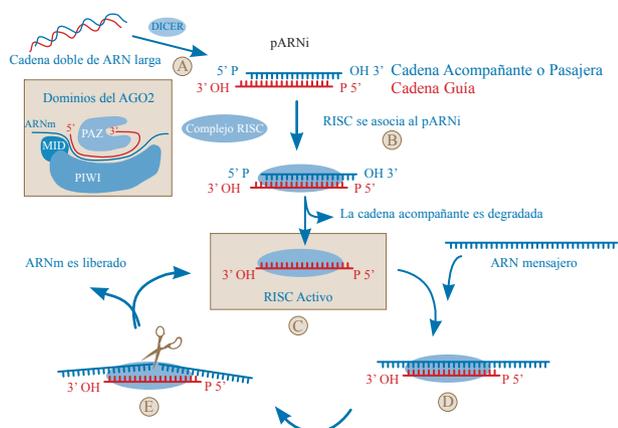
En este caso, se inyectó ARN de doble cadena de gran longitud (varios cientos de pares de bases) preparado mediante el uso de polimerasas. La secuencia de los ARNs así obtenidos estaba presente en diversos genes endógenos como el *unc-22*, *unc-54* o *fem-1*. Tras la inyección de estos ARNs observaron la desaparición de las características que aportaba cada gen con una selectividad total. Además, estos cambios no sólo se producían en el organismo inyectado, sino que se transmitían a su descendencia. Con estos resultados concluyeron que el ARN interfería en la expresión de los genes e introdujeron el término ARN interferente. En este trabajo se evaluó tanto el efecto del uso del ARN de doble cadena y de las cadenas por separado, observándose claramente que la doble cadena era fundamental para obtener una inhibición efectiva. Este hecho sugería un mecanismo completamente nuevo que no tenía nada que ver con los experimentos de antisentido desarrollados años atrás, donde una cadena de oligonucleótido simple bloqueaba la expresión génica.<sup>[11]</sup>

Aunque no pudieron explicar el mecanismo sí determinaron que se trataba de un proceso biológico nuevo que permitía regular la expresión génica. Este trabajo supuso el inicio de la era del ARN interferente.

Tras esta publicación, se inició una carrera para desentrañar el mecanismo del ARN interferente y conocer su alcance. Se observó que era un mecanismo casi universal, ya que tenía lugar en una gran variedad de seres vivos (plantas,<sup>[12]</sup> hongos,<sup>[13]</sup> gusanos,<sup>[14]</sup> anfibios,<sup>[15]</sup> peces,<sup>[16]</sup> insectos<sup>[17]</sup>) sugiriendo que podría estar relacionado con algún mecanismo ancestral de defensa contra los virus. Desafortunadamente no funcionaba de la misma manera en mamíferos. De hecho, al añadir las cadenas largas de ARN a células de mamíferos se activaba la producción del interferón<sup>[18]</sup> mediante la activación de la quinasa PKR,<sup>[19]</sup> lo que finalmente se traducía en la muerte celular. Esto suponía una limitación muy importante para el ARN interferente, ya que cerraba las puertas a su uso en el estudio de la función de genes en mamíferos y a su utilización como futura terapia.

En diversos estudios posteriores sobre el mecanismo del proceso, se observó que las dobles cadenas largas de ARN eran procesadas por una enzima (DICER) dando lugar a fragmentos más cortos de unos 21-23 nucleótidos, lo que indicaba que podían ser los responsables últimos de la inhibición.<sup>[20]</sup> Estos resultados llevaron al grupo de Thomas Tuschel a evaluar la actividad de dúplex de ARN de 21-22 pares de bases, demostrando que estos fragmentos de ARN preparados químicamente daban lugar a la degradación del ARN mensajero de una manera eficiente.<sup>[21]</sup> Este trabajo hizo pensar en la posibilidad de la utilización del ARN interferente en mamíferos, ya que el empleo de dúplex de ARN sintéticos pequeños no activaría la producción de interferón como ocurría antes, lo cual fue efectivamente ratificado por el propio grupo de Thomas Tuschel. Para ello utilizó ARNs de doble cadena cortos y cultivos celulares de diferentes mamíferos, incluyendo células humanas, en experimentos de inhibición de la expresión del gen de la luciferasa.<sup>[22]</sup>

Este trabajo ha permitido trasladar la tecnología del ARN interferente a mamíferos, haciendo posible su utilización en el estudio de la función de los genes y el desarrollo de aplicaciones terapéuticas.



Esquema 2. Mecanismo del ARN interferente.

## Mecanismo del ARN interferente

A pesar del gran interés que existe en el ARN interferente y los esfuerzos orientados a comprenderlo, no se conocen aún todos los componentes implicados en este proceso ni el papel que juegan cada uno de ellos. Por este motivo, aunque se tiene una idea bastante avanzada del mecanismo, es posible que los descubrimientos de los próximos años aporten nueva información e incluso que sea necesario corregir algún punto clave de este proceso. En este artículo se presenta un mecanismo simplificado, que permite entender fácilmente la dinámica del mismo (Esquema 2).

El proceso de inhibición de la expresión génica mediante ARN interferente se inicia cuando una doble cadena de ARN alcanza el citoplasma de una célula y sus extremos 5' son fosforilados por una kinasa.<sup>[23]</sup> Entonces, el dúplex de ARN es reconocido por un complejo proteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que está compuesto de diversas unidades proteicas, de las cuales no todas son conocidas.<sup>[24]</sup> Cuando los dúplex de ARN son de un tamaño grande, uno de los componentes del RISC, conocido como DICER (Esquema 2, A), corta el ARN de doble cadena en porciones más pequeñas (de 21–23 nucleótidos) denominadas pequeños ARN interferentes (pARNi) (*siRNAs*). Estos pequeños dúplex de ARN se incorporan al complejo RISC en uno de sus componentes conocido como AGO2 (Esquema 2, B). Entonces una de las cadenas del pARNi es cortada por la mitad y los dos fragmentos resultantes liberados al citoplasma.<sup>[25]</sup> Esta cadena es conocida como acompañante o pasajera (*passenger*), ya que no tiene un papel significativo durante el proceso. Por otra parte, la cadena complementaria que permanece intacta asociada a AGO2 se denomina guía (*guide*) y es utilizada por el complejo proteico para reconocer la secuencia de ARN mensajero diana.

En el momento en que se libera la cadena pasajera al citoplasma se dice que el complejo RISC está activo (Esquema 2, C) y utiliza la cadena guía para localizar el ARN mensajero diana mediante interacciones estabilizantes

debidas a la complementariedad de bases entre la cadena guía y el ARN mensajero (Esquema 2, D). En esta etapa de reconocimiento son especialmente importantes los nucleótidos 2–8 de la cadena guía próximos al extremo 5', denominada región semilla (*seed region*). Una vez asociado al ARN mensajero diana, el complejo RISC utiliza la actividad de ARNasa presente en el dominio PIWI del AGO2 para cortar el ARN mensajero entre los nucleótidos 10 y 11, al igual que hizo anteriormente con la cadena pasajera (Esquema 2, E). Al liberar los dos fragmentos de ARN mensajero vuelve a generarse el complejo RISC activo que puede actuar de nuevo frente a otra copia de ARN mensajero (Esquema 2, C). De esta manera se entiende la gran capacidad de bloquear la expresión génica del ARN interferente, ya que actúa de manera catalítica, donde una sola unidad de pARNi es capaz de degradar múltiples copias del ARN mensajero. Además, la selectividad que se obtiene es muy elevada ya que es controlada por la complementariedad de bases y, por tanto, sólo debería verse afectado el ARN mensajero cuya secuencia es complementaria a la de la cadena guía.

Un punto importante a aclarar es la manera en que el complejo RISC distingue entre la cadena guía y la pasajera, ya que la que quede finalmente asociada al complejo proteico es la que dirigirá el proceso. Para ello el complejo RISC compara la estabilidad térmica de los extremos del dúplex y la que presente la menor estabilidad en el extremo 5' es la que incorporará finalmente como cadena guía.<sup>[26]</sup> Conociendo este detalle es posible diseñar pARNi con una menor estabilidad térmica en el extremo 5' de la cadena que queremos que actúe como guía. Esto se puede conseguir utilizando pares de bases que formen dos enlaces de hidrógeno (A:U) en el extremo 5' de la cadena guía y pares de bases que formen tres enlaces de hidrógeno (G:C) en el otro extremo. También se puede aumentar la diferencia de estabilidad entre los dos extremos utilizando pares de bases que no den lugar a interacciones estabilizantes, con lo que se mejora la incorporación de la cadena deseada.

Esta hebra guía de ARN queda asociada al complejo AGO2 por sus extremos, así el 5' se sitúa en el dominio MID,<sup>[27]</sup> mientras que el extremo 3' queda en un bolsillo hidrofóbico del dominio PAZ (Esquema 2).<sup>[28]</sup>

Es necesario mencionar que existen otros mecanismos mediante los cuales la formación de proteínas es inhibida sin que se produzca un corte en el ARN mensajero.<sup>[29]</sup> En estos casos el complejo RISC simplemente bloquea la acción del ribosoma parándose por tanto la traducción de la información codificada en el ARNm a la correspondiente proteína. Este es el mecanismo utilizado habitualmente por otros ARNs pequeños que intervienen en la regulación génica, los microARNs,<sup>[30]</sup> ya que el complejo AGO involucrado carece de actividad de ARNasa y no puede por tanto cortar el ARNm diana.

Dada la potencia y selectividad del ARN interferente para inhibir la expresión génica, éste se utiliza normalmente en la obtención de información sobre la función de los genes. Para ello, se utilizan pARNi con la secuencia del gen que se pretende estudiar, bloqueándose la formación de la correspondiente proteína. El análisis del efecto generado en el organismo de estudio permite obtener información relevante sobre el papel del gen inhibido. Para maximizar la eficiencia de la inhibición es necesario diseñar el pARNi de acuerdo a unas reglas en

función del gen que se quiere inhibir, y dada la multitud de diseños posibles es necesario recurrir a algoritmos bioinformáticos. Estas herramientas se han mostrado muy eficaces y además permiten evaluar si el pARNi seleccionado podría inhibir un gen distinto al deseado (*off-target*), lo que daría lugar a efectos no deseados. Por otra parte, el ARN interferente posee un gran potencial terapéutico en enfermedades ocasionadas por la sobre-expresión de genes, ya que mediante la adición de pARNis sería posible reducir la expresión de los genes responsables de la enfermedad a niveles normales.

### Estabilidad, biodistribución y selectividad

Es evidente que el potencial del ARN interferente es enorme y esto ha provocado que una gran variedad de grupos de investigación y empresas farmacéuticas y biotecnológicas se hayan embarcado en el desarrollo de tratamientos de diversas enfermedades basados en el ARN interferente. Pero quizás el desarrollo de estas terapias se esté produciendo demasiado rápido ya que, como se ha comentado anteriormente, aún no se conoce completamente el mecanismo del ARN interferente ni las implicaciones del mismo. A pesar de ello, diversos grupos de investigación y empresas están centrados en resolver los problemas más técnicos relacionados con el uso de los pARNi como agentes terapéuticos, como son los relacionados con la estabilidad, biodistribución y selectividad. En este sentido, parece claro que el uso de modificaciones químicas es fundamental para resolverlos y es lo que permitirá en un futuro disponer de tratamientos basados en ARN interferente.<sup>[31]</sup>

El problema de la estabilidad del ARN quizás sea el más importante, ya que el ARN es un producto delicado que se degrada muy rápidamente a pHs elevados o en presencia de ARNasas, por lo que hay que tener especial cuidado durante su preparación y manipulación.

En relación con su aplicación terapéutica hay que asegurar que llegue intacto a la célula diana ya que su actividad podrá verse disminuida drásticamente o, lo que sería peor, producir un efecto no deseado. Una vez se haya administrado un pARNi a un ser vivo sería ideal, como con cualquier fármaco, que pudiese circular a lo largo del cuerpo hasta alcanzar la célula diana con elevada selectividad y sin ser degradado. Además, una vez alcanzado su objetivo tendrá que cruzar la membrana lipídica celular para llegar al citoplasma, lo que resulta difícil debido a las cargas negativas que le confieren los grupos fosfato que unen los nucleótidos de las cadenas de ARN. En este sentido se han desarrollado diversas formulaciones para la administración de pARNis que están mostrando resultados prometedores en animales,<sup>[32]</sup> incluido en humanos.<sup>[33]</sup>

Por otra parte, aunque se le presupone al ARN interferente una selectividad total, esto puede no ser siempre así, lo que podría implicar consecuencias fatales. En el caso en el que haya un ARN mensajero con una secuencia muy similar al que se quiere inhibir es posible que también se vea afectado. Además, si la hebra pasajera se incorpora finalmente al complejo RISC, será ésta y no la diseñada *a priori* como guía la que induzca la degradación del ARN mensajero. Estos casos pueden ser menores, pero al tratarse de un arma tan potente se corre el riesgo de inhibir un gen vital para el correcto funcionamiento de la célula.

Como se ha mencionado anteriormente los problemas relacionados con la estabilidad, biodistribución y selectividad de los pARNis pueden resolverse, al menos en parte, mediante el uso de modificaciones químicas, las cuales se incorporan al ARN durante su preparación.

### Síntesis química de ARN

Los métodos de preparación de ARN sintético son relativamente sencillos y requieren de un sintetizador de ADN/ARN que lleva a cabo la síntesis de una manera automatizada. Para ello es necesario disponer de los monómeros que constituyen el ARN convenientemente funcionalizados con distintos grupos protectores o activantes.<sup>[34]</sup> La síntesis tiene lugar en fase sólida donde, partiendo del primer nucleótido, se va alargando la cadena a voluntad mediante la adición consecutiva de los nucleótidos requeridos para configurar la secuencia deseada. En este proceso es posible utilizar nucleótidos modificados, con el fin de aportar nuevas propiedades a la cadena de ARN. Gracias a la síntesis química diversos investigadores han podido utilizar en sus estudios pARNis de distinto tamaño e incluso con modificaciones, lo que ha permitido dilucidar partes importantes del mecanismo del ARN interferente. Además, el uso de determinadas modificaciones está permitiendo mejorar las características de los pARNis con el fin de obtener un producto terapéutico efectivo.

Las modificaciones desarrolladas son de diversos tipos y, por lo general, se intenta que afecten lo mínimo a la actividad de inhibición génica. Por esta razón suelen ser modificaciones de tamaño pequeño que se introducen en la hebra pasajera, ya que como se ha visto al hablar del mecanismo su interacción con el complejo proteico RISC y el ARN mensajero es menor que la de la hebra guía. Estas modificaciones pueden incorporarse en la estructura derivada del azúcar de ribosa, en el enlace fosfodiéster que une los nucleótidos de la cadena o en la base nucleica. Además, el efecto producido puede variar dependiendo de la posición en la se sitúen a lo largo de la cadena y del número de modificaciones introducidas. A continuación se comentarán las modificaciones más habituales utilizadas en los pARNis.

### Modificaciones en el azúcar

Respecto a las modificaciones en el azúcar, las más empleadas son aquellas en las que se modifica el grupo hidroxilo de la posición 2', ya que está involucrado en la ruptura del enlace fosfodiéster. Así, al modificar este grupo, es posible conseguir un aumento en la estabilidad del ARN en suero. Además, las modificaciones en esta posición proporcionan una mayor afinidad por la cadena complementaria, aumentando la estabilidad térmica de los pARNis. Entre este tipo de modificaciones destacan los grupos flúor y metoxilo, los cuales han sido utilizados ampliamente.<sup>[35]</sup>

Otro aspecto destacable del uso de este tipo de sustituyentes es que no distorsionan la conformación del azúcar, que es necesaria para mantener la estructura de tipo A presente en el dúplex de ARN, la cual resulta imprescindible para que tenga lugar el proceso.

Por estas razones, este tipo de modificaciones son utilizadas frecuentemente cuando se busca una mejora en la actividad.

Además, también han sido muy útiles en el estudio del mecanismo del ARN interferente. En concreto, el uso de nucleótidos modificados con grupos OMe en la posición 2' ha permitido descubrir que la cadena pasajera tiene que ser cortada entre los nucleótidos 9 y 10 para que pueda iniciarse el proceso.<sup>[25]</sup> El uso de este tipo de modificaciones en la cadena pasajera reduce sensiblemente la actividad de ARNasa del complejo RISC, ya que, debido al mayor volumen de los grupos OMe, el catión  $Mg^{2+}$ , necesario para la actividad de ARNasa, no puede ocupar la posición adecuada dentro del complejo RISC.<sup>[36]</sup> El efecto en la actividad de ARNasa es tan significativo que se han utilizado cadenas pasajeras con este tipo de modificaciones en la parte central como inhibidores del proceso de ARN interferente.<sup>[37]</sup> En el caso de usar modificaciones con un grupo flúor en la cadena pasajera la actividad de ARNasa no se ve inhibida, posiblemente debido a que el tamaño de este grupo es menor y en este caso el catión  $Mg^{2+}$  puede ocupar su posición.<sup>[38]</sup>

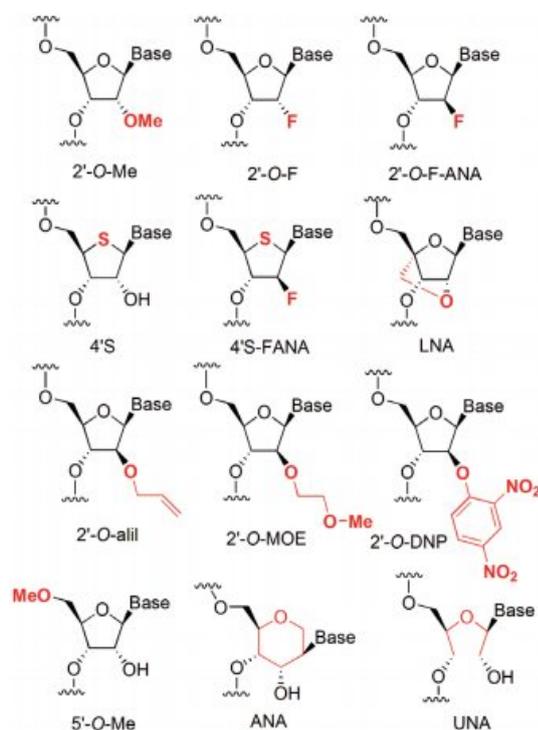


Figura 3. Modificaciones químicas en el azúcar.

Los derivados fluorados han mostrado buena actividad en experimentos en cultivos celulares, posiblemente como consecuencia de su mayor estabilidad en suero comparada con sus análogos sin modificar (Figura 3). No obstante, en algunos casos, esta diferencia de actividad no ha podido observarse en experimentos en animales, lo que puede deberse a la mala farmacocinética de los pARNis modificados con este grupo.<sup>[39]</sup> También se han utilizado compuestos fluorados con la configuración opuesta dando lugar a los derivados FANA, que presentan una mayor estabilidad en suero mientras que no reducen la actividad cuando se incorporan en la cadena pasajera o en los extremos de la guía.<sup>[40]</sup>

En la posición 2' también se han introducido otras modificaciones más voluminosas, como cadenas alquílicas (MOE),<sup>[41]</sup> alílicas<sup>[42]</sup> o grupos aromáticos,<sup>[43]</sup> pero en estos

casos, debido al mayor tamaño de estos derivados, es necesario colocarlos en posiciones terminales o en la cadena pasajera para evitar que la actividad disminuya.

Otra modificación interesante es la que involucra la formación de un puente entre el hidroxilo de la posición 2' y el carbono 4' del azúcar (Figura 3). Estas estructuras se conocen como ácidos nucleicos de conformación restringida (*Locked Nucleic Acids*, LNA) y, además de ser más estables frente a la degradación, aumentan significativamente la estabilidad de los dúplex formados entre cadenas modificadas con estos derivados.<sup>[44]</sup> Es importante tener en cuenta que el número de este tipo de modificaciones debe mantenerse en el mínimo para que la actividad de ARN interferente no se vea afectada.<sup>[45]</sup>

El resto de posiciones de la estructura del azúcar también se han modificado, aunque en menor medida (Figura 3). Por ejemplo, el anillo de furano se ha sustituido por tiofeno,<sup>[46]</sup> por un anillo de seis miembros como los derivados del altritol (ANA)<sup>[47]</sup> o por un derivado abierto de ribosa (*Unlocked Nucleic Acids* UNA).<sup>[48]</sup>

Como puede verse, el uso de las modificaciones químicas está enfocado principalmente a aumentar la estabilidad en suero, pero adicionalmente pueden aportar otras propiedades muy positivas de cara a su uso como terapia. En particular, dependiendo del tipo de modificación, éstas pueden interactuar con proteínas presentes en la sangre y mejorar su biodistribución e incluso facilitar su translocación en el citoplasma celular. También se ha comprobado que el uso de modificaciones químicas puede reducir los efectos secundarios derivados de la inhibición de un gen distinto al deseado (*off-target effects*).<sup>[49]</sup> Este efecto se ha observado cuando las modificaciones se incorporan en la región semilla de la cadena guía.

Por otro lado, también se ha descrito que la introducción de modificaciones en el extremo 5' puede reducir significativamente la inhibición de genes no deseados. Esto se debe a que el proceso de selección de la cadena guía por el complejo RISC no es perfecto y una pequeña proporción de la cadena pasajera puede incorporarse en su interior. Cuando esto tiene lugar el complejo RISC activo inhibe el gen complementario a la cadena pasajera, lo que puede tener consecuencias fatales. Mediante la metilación del hidroxilo 5' del azúcar en el extremo 5' de la cadena pasajera se bloquea la fosforilación por quinasas de esta posición y, por tanto, su incorporación en el complejo RISC,<sup>[50]</sup> ya que se ha observado que la cadena guía presenta un grupo fosfato en esta posición. La introducción de este tipo de modificaciones se ha mostrado más eficaz a la hora de dirigir la entrada de la cadena guía en el complejo RISC que las aproximaciones basadas en la estabilidad térmica de los extremos 5' comentada anteriormente.

### Modificaciones en el enlace fosfato

Dado que la degradación de las cadenas de ARN se produce por la ruptura de los enlaces fosfodiéster, varias modificaciones se han centrado en aumentar la estabilidad de este enlace. Dentro de estas modificaciones, los fosforotionatos (Figura 4) han gozado de cierta popularidad,<sup>[31,41]</sup> heredada de las técnicas de antisentido,<sup>[51]</sup> donde la introducción de estos derivados mejoraba tanto la estabilidad<sup>[52]</sup> como la farmacocinética de los oligonucleótidos debido a su interacción con proteínas presentes en el suero.<sup>[53]</sup> En el caso de los pARNis no se ha obser-

vado una mejora clara en la biodistribución<sup>[54]</sup> y en cuanto a la estabilidad sólo se ha visto mejorada en el caso de los duplex de pARNis, ya que este grupo no estabiliza cadenas simples de ARN.<sup>[45]</sup> Además, se ha observado cierta toxicidad cuando se introducen varias modificaciones en un pARNi.<sup>[42]</sup> Por otra parte, el grupo boranofosfato ha mostrado unas propiedades muy interesantes, ya que puede ser utilizado en diversas posiciones de ambas cadenas del pARNi, dando lugar a pARNis más activos que los modificados con fosfotonatos, pero sin la citotoxicidad anteriormente comentada.<sup>[55]</sup>

Otro grupo utilizado en la conexión de nucleótidos es el enlace amida, el cual se ha utilizado exclusivamente en los extremos 3' de los pARNi, aportando una mayor resistencia a exonucleasas.<sup>[56]</sup>

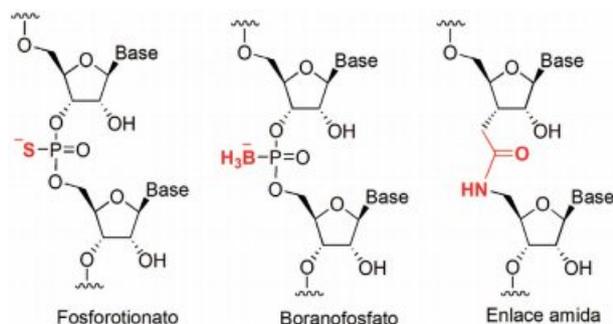


Figura 4. Modificaciones en el enlace fosfato.

## Modificaciones en la nucleobase

Las modificaciones en la nucleobase no son tan habituales como las comentadas anteriormente debido a que el mayor esfuerzo en el desarrollo de modificaciones está enfocado a aumentar la estabilidad de los siRNAs en suero, y mediante la modificación de las nucleobases no es de esperar (*a priori*) un gran efecto estabilizante, ya que se encuentran alejadas de los grupos que intervienen en la ruptura del enlace fosfodiéster. A pesar de ello su uso puede dificultar el reconocimiento de los pARNis por ARNasas y conferir, por tanto, una mejora en la estabilidad en suero. Por otra parte, este tipo de modificaciones pueden aportar información de la estructura del complejo RISC así como del proceso de reconocimiento de la secuencia de ARN mensajero, puesto que interaccionan tanto con el complejo proteico como con el ARN mensajero.

Entre las modificaciones utilizadas se encuentran los derivados bromados y yodados en la posición 5' del uracilo<sup>[57]</sup> y, recientemente, los derivados con un resto metilo y propilo en esta posición (Figura 5).<sup>[58]</sup> Estos grupos estabilizan la formación del dúplex y confieren una mayor estabilidad frente a ARNasas. También se han utilizado tio-derivados de uracilo,<sup>[59]</sup> que han mostrado una mayor afinidad por la cadena diana aumentando la actividad y especificidad del proceso.

Entre este grupo de modificaciones es interesante destacar el uso de los derivados de benceno dihalogenados, como el 2,4-difluorobenceno (Figura 5). Este derivado es un análogo no polar del uracilo, ya que presenta el mismo tamaño y forma que el uracilo, pero la ausencia de grupos polares le impide formar enlaces de hidrógeno con su base complementaria (adenina). Este derivado ha permitido estudiar el papel

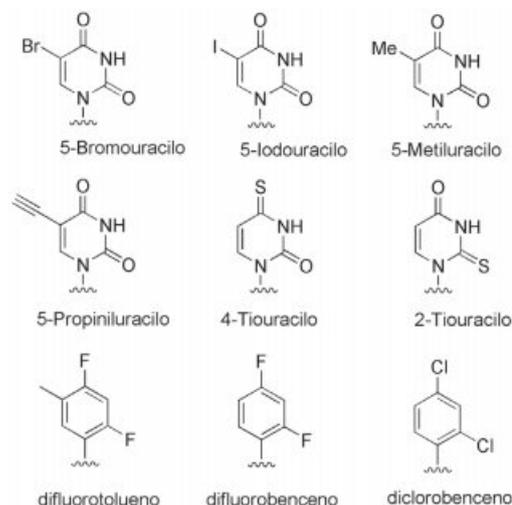


Figura 5. Modificaciones en la nucleobase.

del enlace de hidrógeno en el reconocimiento del ARN mensajero y en la actividad.<sup>[60]</sup> De los trabajos desarrollados por el grupo del Prof. Kool en esta línea se deduce que el enlace de hidrógeno es vital en las posiciones centrales de la cadena, pero no así en otras, como en los extremos. Esto se debe a que la actividad de ARNasa sólo puede producirse cuando los ribonucleótidos del ARN mensajero están orientados de la forma adecuada y ésto se consigue mediante la interacción favorable entre la cadena guía y el ARN mensajero debida a los enlaces de hidrógeno. En estos trabajos se ha observado que el reconocimiento entre el ARN mensajero y la cadena guía en la posición 7 de la cadena guía está preferentemente controlada por efectos estéricos. En particular, cuando se utilizaron los análogos fluorado se observó que la selectividad frente a ARN mensajeros mutados en esa posición no se veía disminuida por la ausencia de enlaces de hidrógeno. De hecho, se conseguía una discriminación total entre secuencias sin mutación y mutadas a guanina, mientras que los siRNAs sin modificación eran incapaces de discriminar esta mutación. Esta discriminación entre nucleobases era más notable cuando se utilizaba el derivado de diclorobenceno,<sup>[61]</sup> debida posiblemente al aumento de tamaño de la nucleobase.

Estos resultados son interesantes desde el punto de vista de la investigación básica, puesto que aportan información estructural del complejo RISC asociado a la cadena guía y al ARN mensajero. Los resultados obtenidos sugieren que el complejo RISC fuerza la aproximación entre la cadena guía y el ARN mensajero en torno a la posición 7, con lo que la estabilización por enlace de hidrógeno pasaría a un segundo plano, siendo más significativos los efectos estéricos.<sup>[56]</sup> Adicionalmente, estos resultados también son interesantes desde un punto de vista más aplicado, ya que podría utilizarse este tipo de derivados para discriminar genes mutados e incluso reducir los *off-target effects* mencionados anteriormente.

El uso de derivados fluorados para estudiar enlaces de hidrógeno puede no ser perfecto ya que es posible que haya alguna interacción estabilizante entre los átomos de flúor de una molécula y los hidrógenos de otra. Además, otro tipo de interacciones estabilizantes como pueden ser las fuerzas de apilamiento ( $\pi$ -stacking) pueden estar jugando algún papel. A

pesar de estos riesgos, que siempre hay que tener en cuenta, este modelo es una estrategia excelente para el estudio del papel de los enlaces de hidrógeno en procesos biológicos, que ha sido ampliamente utilizada en otros trabajos con ADN,<sup>[62]</sup> como en el estudio de polimerasas. Además, su uso con ARN ha permitido obtener la estructura de rayos-X de un dúplex donde la base de un ribonucleótido ha sido sustituida por el difluorotolueno en la que no se observa enlace de hidrógeno con la base complementaria.<sup>[63]</sup> Por tanto, la estabilización debida al enlace de hidrógeno en este tipo de experimentos parece descartada.

Por otra parte, recientemente hemos estudiado la interacción de diversas modificaciones con el dominio PAZ del complejo RISC y su efecto en la actividad de ARN interferente. Para ello se introdujo en el extremo 3' de la cadena guía un aminodiol modificado con grupos de diverso tamaño como son el pireno, antraceno, naftaleno, trifluorometilbenzeno, flurorobenceno y metilo.<sup>[64]</sup> En el dominio PAZ existen diversos residuos aromáticos que pueden interactuar con estos grupos, estabilizando el complejo RISC-cadena guía. Los experimentos mostraron que los pARNis modificados con los grupos de mayor tamaño daban lugar a la inhibición génica de manera menos eficiente. Este efecto puede deberse a efectos estéricos o a efectos estabilizantes debido a una interacción favorable entre los grupos aromáticos de la cadena guía y el bolsillo del dominio PAZ. Esta interacción favorable puede dificultar la liberación de la cadena guía del dominio PAZ durante el proceso de ARN interferente, lo cual es necesario para que el complejo adopte la conformación adecuada y tenga lugar el proceso. En nuestro caso nos inclinamos por el efecto estabilizante, ya que las modificaciones utilizadas deberían encajar en el bolsillo del dominio PAZ fácilmente y además estabilizar su interacción mediante fuerzas de apilamiento ( $\pi$ -stacking).

## Otras modificaciones

Finalmente, cabe mencionar brevemente otras modificaciones que, aunque no están integradas a la estructura de los pARNis, aportan una funcionalidad interesante. Entre éstas hay que destacar los derivados conjugados que mejoran la biodistribución e internalización a las células de los pARNis como son los derivados de colesterol<sup>[65]</sup>, determinadas secuencias pépticas,<sup>[66]</sup> carbohidratos,<sup>[67]</sup> anticuerpos,<sup>[68]</sup> así como diversas nanoestructuras (nanopartículas,<sup>[69]</sup> nanotubos<sup>[70]</sup> y puntos cuánticos<sup>[71]</sup>). También es necesario resaltar el uso de un derivado foto-lábil en los pARNis que permite iniciar el proceso de inhibición de la expresión génica mediante irradiación con luz.<sup>[72]</sup>

## Conclusiones

El ARN interferente tiene unas grandes posibilidades de convertirse en una de las herramientas terapéuticas más potentes del futuro. No obstante, será necesario mejorar aún ciertos aspectos relacionados con la estabilidad, biodistribución y selectividad, para que los pARNis puedan alcanzar las células diana, atravesar la membrana lipídica e inhibir únicamente el gen deseado de una manera eficiente. Para ello, el uso de pARNis modificados químicamente parece ser fundamental.

## Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Ramón Eritja sus comentarios durante la elaboración de este manuscrito, así como su pasión por la ciencia.

## Referencias

1. A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
2. S. A. Wingard, *J. Agric. Res.* **1928**, *37*, 127–153.
3. C. Smith, C. Watson, C. Bird, J. Ray, W. Schuch, et al, *Mol. Gen. Genet.* **1990**, *224*, 477–481.
4. C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant. Cell.* **1990**, *2*, 279–289.
5. M. A. Matzke, A. J. M. Matzke, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e133.
6. H. Vaucheret, C. Béclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J.-B. Morel, P. Mourrain, J.-C. Palauqui, S. Vernhettes, *Plant J.* **1998**, *16*, 651–659.
7. C. Cogoni, G. Macino, *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 438–443.
8. A. Fire, D. Alberson, S. Harrison, D. Moerman, *Development* **1991**, *113*, 503–514.
9. a) K. M. Takayama, M. Inouye, *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* **1990**, *25*, 155–184. b) Y. Eguchi, T. Itoh, J.-I. Tomizawa, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 631–652.
10. Imagen obtenida de Wikipedia Commons.
11. a) D. K. Monteith, A. A. Levin, *Toxicol. Pathol.* **1999**, *27*, 8–13. b) T. Aboul-Fadl, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2193–2214. c) J. H. Chan, S. Lim, W. F. Wong, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 533–540.
12. P. M. Waterhouse, M. W. Graham, M. B. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 13959–13964.
13. A. Chicas, C. Cogoni, G. Macino, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4237–4243.
14. A. G. Fraser, R. S. Kamath, P. Zipperlen, M. Martinez-Campos, J. Ahringer, *Nature*, **2000**, *408*, 325–330.
15. Y. Zhou, Y. Ching, K. H. Kok, H. Kung, D. Jin, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1664–1669.
16. A. Oates, A. Bruce, R. Ho, *Dev. Biol.* **2000**, *224*, 20–28.
17. J. Kennerdell, R. Carthew, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 896–8.
18. G. R. Stark, I. M. Kerr, B. R. G. Williams, R. H. Silverman, R. D. Schreiber, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 227–264.
19. M. J. Clemens, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 945–949.
20. a) A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe, *Science*, **1999**, *286*, 950–952. b) P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp, D. P. Bartel, *Cell*, **2000**, *101*, 25–33.
21. S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 188–200.
22. S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature*, **2001**, *411*, 494–498.
23. A. Nykänen, B. Haley, P. D. Zamore, *Cell*, **2001**, *107*, 309–321.
24. T. M. Rana, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 23–26.
25. a) C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore, *Cell*, **2005**, *123*, 607–620. b) T. A. Rand, S. Petersen, F. Du, X. Wang, *Cell*, **2005**, *123*, 621–629.
26. a) D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell*, **2003**, *115*, 199–208. b) A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell*, **2003**, *115*, 209–216.
27. J.-B. Ma, Y.-R. Yuan, G. Meister, Y. Pei, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature*, **2005**, *434*, 666–670.

28. a) J.-J. Song, S. K. Smith, G. J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Science*, **2004**, *305*, 1434–1437. b) Y. Wang, S. Juranek, H. Li, G. Sheng, G. S. Wardle, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature*, **2009**, *461*, 754–761.
29. a) C. C. Mello, D. Conte Jr, *Nature*, **2004**, *431*, 338–342. b) G. Meister, T. Tuschl, *Nature*, **2004**, *431*, 343–349.
30. V. Ambros, *Nature*, **2004**, *431*, 350–355.
31. a) M. Manoharan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 570–579. b) B. Nawrot, K. Sipa, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 913–925. c) J. K. Watts, G. F. Deleavey, M. J. Damha, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 842–855. d) J. B. Bramsen *et al.* *Nucleic Acid Res.* **2009**, *37*, 2867–2881.
32. S. Carmona, M. R. Jorgensen, S. Kolli, C. Crowther, F. H. Salazar, P. L. Marion, M. Fujino, Y. Natori, M. Thanou, P. Arbuthnot, A. D. Miller, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 706–717.
33. M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel, A. Ribas, *Nature*, **2010**, *464*, 1067–1070.
34. a) N. Usman, K. K. Ogilvie, M. Y. Jiang, R. L. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7845–7854. b) Á. Somoza, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2668–2676.
35. Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, *9*, 1034–1048.
36. D. S. Schwarz, Y. Tomari, P. D. Zamore, *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 787–791.
37. a) G. Meister, M. Lanthaler, Y. Dorsett, T. Tuschl, *RNA*, **2004**, *10*, 544–550. b) G. Hutvágner, M. J. Simard, C. C. Mello, P. D. Zamore, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 465–475.
38. P. Muhonen, T. Tennilä, E. Azhayeva, R. N. Parthasarathy, A. J. Janckila, H. Kalervo, Väänänen, A. Azhayev, T. Laitala-Leinonen, *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 858–873.
39. J. M. Layzer, A. P. McCaffrey, A. K. Tanner, Z. Huang, M. A. Kay, B. A. Sullenger, *RNA* **2004**, *10*, 766–771.
40. T. Dowler, D. Bergeron, A.-L. Tedeschi, L. Paquet, N. Ferrari, M. J. Damha, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1669–1675.
41. T. P. Prakash, C. R. Allerson, P. Dande, T. A. Vickers, N. Sioufi, R. Jarres, B. F. Baker, E. E. Swayze, R. H. Griffey, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4247–4253.
42. M. Amarzguioui, T. Holen, E. Babaie, H. Prydz, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 589–595.
43. X. Chen, L. Shen, J. H. Wang, *Oligonucleotides* **2004**, *14*, 90–99.
44. a) J. Elmén, H. Thonberg, K. Ljungberg, M. Frieden, M. Westergaard, Y. Xu, B. Wahren, Z. Liang, H. Ørum, T. Koch, C. Wahlestedt, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 439–447. b) J. B. Bramsen, M. B. Laursen, C. K. Damgaard, S. W. Lena, B. R. Babu, J. Wengel, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5886–5897. c) O. R. Mook, F. Baas, M. B. de Wissel, K. Fluiter, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 833–843. d) M. Dutkiewicz, H.-P. Grunert, H. Zeichhardt, S. W. Lena, J. Wengel, J. Kurreck, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3061–3066.
45. D. A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M. A. White, D. R. Corey, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7967–7975.
46. a) S. Hoshika, N. Minakawa, H. Kamiya, H. Harashima, A. Matsuda, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3115–3118. b) P. Dande, T. P. Prakash, N. Sioufi, H. Gaus, R. Jarres, A. Berdeja, E. E. Swayze, R. H. Griffey, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1624–1634.
47. M. Fisher, M. Abramov, A. Van Aerschot, D. Xu, R. L. Juliano, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1064–1074.
48. D. M. Kenski, A. J. Cooper, J. J. Li, A. T. Willingham, H. J. Haringsma, T. A. Young, N. A. Kuklin, J. J. Jones, M. T. Cancilla, D. R. McMasters, M. Mathur, A. B. Sachs, W. M. Flanagan, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 660–671.
49. O. Snøve, Jr., J. Rossi, *ACS Chem. Bio.* **2006**, *1*, 274–276.
50. P. Y. Chen, L. Weinmann, D. Gaidatzis, Y. Pei, M. Zavolan, T. Tuschl, G. Meister, *RNA*, **2008**, *14*, 263–274.
51. J. B. Opalinska, A. M. Gewirtz, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 503–514.
52. F. Ecjstein, *Antisense Nucl. Acid. Drug Dev.* **2000**, *10*, 117–121.
53. R. S. Geary, R. Z., Yu, A. A. Levin, *curr. Opin. Invest. New Drugs* **2001**, *2*, 562–573.
54. D. A. Braasch, Z. Paroo, A. Constantinescu, G. Ren, O. K. Óz, R. P. Mason, D. R. Corey, *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1139–1143.
55. A. H. S. Hall, J. Wan, E. E. Shaughnessy, B. R. Shaw, K. A. Alexander, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5991–6000.
56. R. Iwase, T. Toyama, K. Nishimori, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2007**, *26*, 1451–1454.
57. S. Parrish, J. Fleenor, S. Xu, C. Mello, A. Fire, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 1077–1087.
58. M. Terrazas, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 346–353.
59. K. Sipa, E. Sochacka, J. Kazmierczak-Baranska, M. Maszewska, M. Janicka, G. Nowak, B. Nawrot, *RNA*, **2007**, *13*, 1301–1316.
60. A. Somoza, J. Chelliserrykattil, E. T. Kool, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4994–4997.
61. Á. Somoza, A. P. Silverman, R. M. Miller, J. Chelliserrykattil, E. T. Kool, *Chem.--Eur. J.* **2008**, *14*, 7978–7987.
62. E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 990–1009.
63. J. Xia, A. Noronha, I. Toudjarska, F. Li, A. Akinc, R. Braich, M. Frank-Kamentsky, K. G. Rajeev, M. Egli, M. Manoharan, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 176–182.
64. Á. Somoza, M. Terrazas, R. Eritja, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4270–4272.
65. J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Kotrlinsky, S. Limmer, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, *Nature*, **2004**, *432*, 173–178.
66. a) Y. L. Chiu, A. Ali, C. Y. Chu, H. Cao, T. M. Rana, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1165–1175. b) A. Aviñó, S. M. Ocampo, C. Caminal, J. C. Perales, R. Eritja, *Mol. Divers.* **2009**, *13*, 287–293.
67. H. Yan, K. Tram, *Glycoconjugate J.* **2007**, *24*, 107–123.
68. C. F. Xia, Y. Zhang, Y. Zhang, R. J. Boado, W. M. Pardridge, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 2309–2316.
69. a) A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021. b) D. A. Giljohann, D. S. Seferos, A. E. Prigodich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2072–2073.
70. N. W. Kam, Z. Liu, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12492–12493.
71. M. V. Yezhlyev, L. Qi, R. M. O'Regan, S. Nie, X. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9006–9012.
72. a) S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328–1332. b) S. Shah, P. K. Jain, A. Kala, D. Karunakaran, S. H. Friedman, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4508–4517.