

# RNA de interferencia: el silencio de los genes

Tomás López, Daniela Silva, Susana López y Carlos Arias

“El camino a todas las cosas grandes pasa por el silencio”  
Friedrich Nietzsche

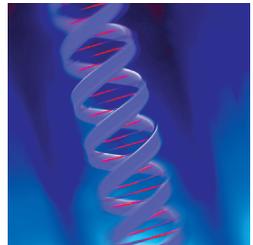
## Biología del RNA de interferencia

Uno de los avances más importantes en la biología de las últimas décadas ha sido el descubrimiento de moléculas de RNA que regulan la expresión de genes. La principal función que se le ha reconocido al RNA es como parte de la maquinaria de producción de proteínas. Los RNA mensajeros (mRNA) son los intermediarios en la expresión de genes, transmitiendo información entre el DNA y la maquinaria de síntesis de proteínas. Los RNA de transferencia (tRNA) son el elemento decodificador que permite traducir de un lenguaje de nucleótidos (el que tiene el DNA y el mRNA) a un lenguaje de aminoácidos (el de las proteínas), y los RNA ribosomales (rRNA) son parte de la maquinaria que produce las proteínas.

El silenciamiento por RNA es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza en el que moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) regulan la expresión de genes. El fenómeno fue inicialmente descubierto en 1990, cuando botánicos que se encontraban trabajando con petunias intentaron sobre-expresar a la enzima que produce el color púrpura (llamada chalcona sintasa). Para ello introdujeron varias copias del gen que codifica para esta enzima esperando encontrar que las plantas que sobre-expresaran a la chalcona sintasa fueran púrpuras. Sin embargo, descubrie-

ron que se generaban flores sin color o con parches blancos. Al analizar los niveles de la enzima encontraron que eran 50 veces menores a los de las plantas originales. Esta observación implicaba que los genes que introdujeron no se estaban expresando, pero también que el gen natural de la planta dejaba de expresarse, por esta razón al fenómeno se le llamó co-supresión. Un fenómeno equivalente fue descrito dos años después en un hongo conocido como *Neurospora crassa*; a este fenómeno le llamaron *quelling* (“detener abruptamente”). Estas observaciones fueron mejor entendidas en 1998 gracias a Andrew Fire y Craig Mello, quienes por su trabajo recibieron el premio Nobel de medicina 2006. Ellos descubrieron que tras la inyección de dsRNA dentro del nemátodo *Caenorhabditis elegans* se producía un silenciamiento de la expresión de genes que era específico de secuencia, es decir, que la expresión del gen que presenta la misma secuencia que el dsRNA se inhibía. Este fenómeno explicaba tanto la co-supresión como el *quelling* y fue denominado interferencia de RNA (RNAi).

El mecanismo de la RNAi fue descrito *in vitro* utilizando extractos de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Estos estudios revelaron que moléculas largas de dsRNA eran cortadas en fragmentos pequeños con una estructura



específica: dos cadenas de 21 a 25 nucleótidos interaccionado en forma de dúplex, donde 19 nucleótidos se encuentran formando RNA de doble cadena y dos nucleótidos sin aparearse en los extremos (figura 1). Estas moléculas fueron denominadas RNA interferentes pequeños (siRNA) y se demostró que son las mediadoras del proceso de interferencia.

Hasta el año 2000, la RNAi fue una herramienta que se utilizó para apagar la expresión de genes en varios organismos, pero no en mamíferos. Esto debido a que las moléculas grandes de dsRNA (de más de 30 pares de bases) inducen en células de mamífero una respuesta que generalmente desencadena la muerte de la célula. Sin embargo, ese año el grupo de Tom Tuschl describió que cuando se utilizan directamente los siRNA, es posible inducir el proceso de interferencia en células de mamífero sin que despierte la respuesta que conduce a la muerte celular. Este descubrimiento abrió la posibilidad de utilizar la interferencia de RNA como una herramienta en la investigación enfocada a células de mamíferos.

### El silenciamiento: biogénesis y mecanismos de interferencia

Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de RNA que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia, las más ampliamente los RNA interferentes pequeños (siRNA) y los microRNA (miRNA).

#### siRNA

Estas moléculas tienen un tamaño de 21 a 25 nucleótidos y son producidas a partir de precursores de RNA de doble cadena que pueden variar de tamaño y origen (figura 1). Estos precursores son procesados por miembros de la familia de enzimas que degradan RNA, conocidas como la familia de la RNAsa tipo III. En particular, la enzima que degrada los precursores de dsRNA hasta siRNA se conoce como *dicer*. Los siRNA resultantes son incorporados a un complejo denominado siRISC (*RNA-induced silencing complex*). Este complejo está compuesto por

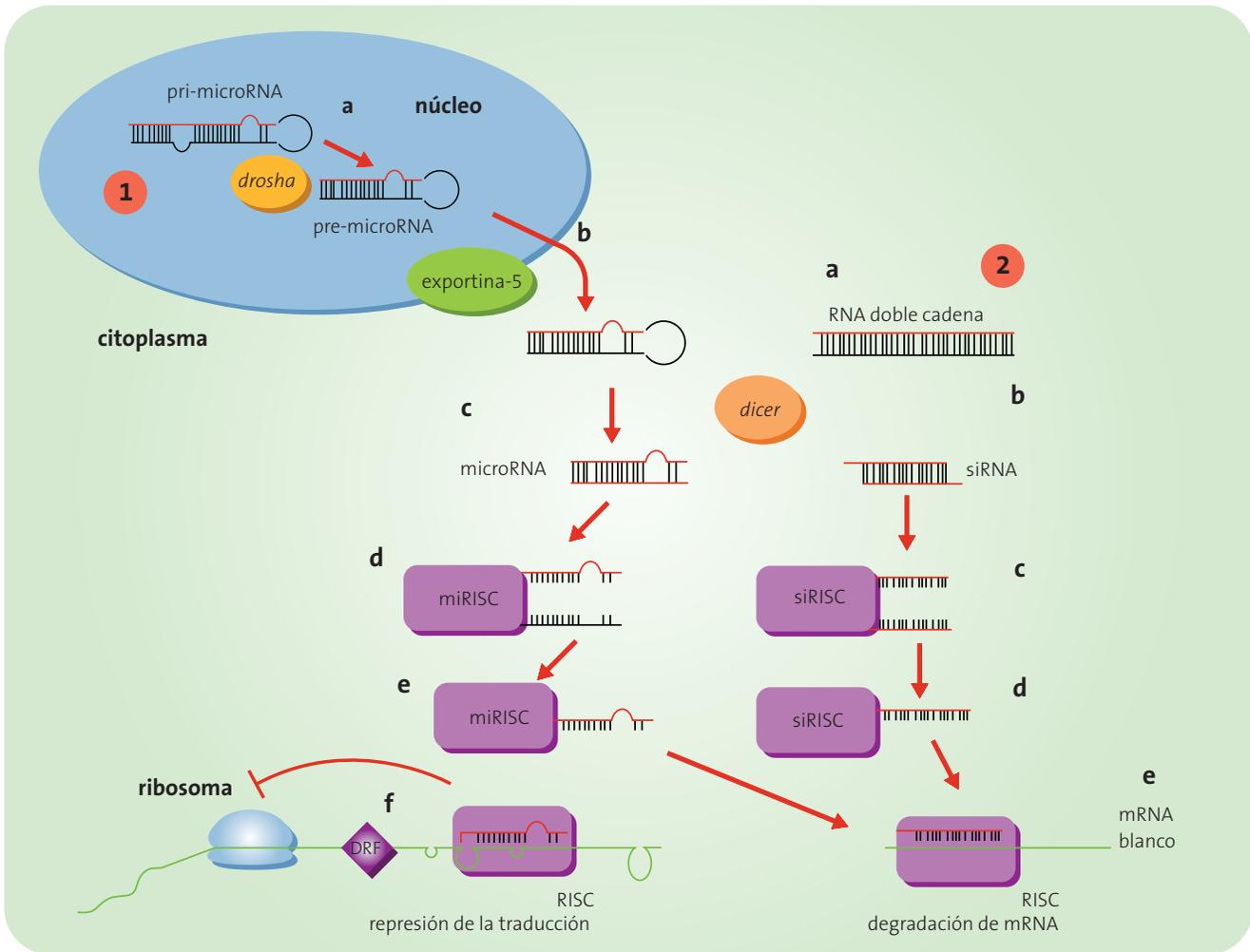
numerosas proteínas celulares. La incorporación del siRNA al siRISC está acoplada a la separación de las dos cadenas en cadenas sencillas, sólo una de las cuales, conocida como cadena guía, se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el mRNA con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas de mRNA complementarias son encontradas, la interacción entre el siRNA y este mRNA desemboca en el corte del mRNA y su posterior degradación.

En plantas, los siRNA pueden ser transportados al núcleo e inhibir la síntesis del mRNA a partir del gen correspondiente, fenómeno que se conoce como silenciamiento transcripcional.

Otro fenómeno importante que ocurre en varios organismos, pero no en mamíferos, es que los mediadores de la interferencia pueden viajar desde las células en que se producen hasta otras células del organismo. De esta manera es posible lograr que se silencie la expresión de un gen en el organismo completo, aunque la inducción original haya sido solamente en una parte. En este tipo de organismos, como el gusano *C. elegans*, el silenciamiento es heredable.

#### microRNA

Aunque presentan mucha similitud con los siRNA, los microRNA son producidos por una vía de síntesis diferente. Los precursores de los microRNA son transcritos a partir de genes celulares, tal y como se producen los mRNA. A esta primer molécula de RNA se le denomina microRNA primario (pri-microRNA) y es procesada en el núcleo por otra enzima de la familia RNAsa tipo III denominada *droscha*. El resultado del corte de *droscha* es una molécula de RNA de entre 70 y 100 nucleótidos con una estructura compleja. Partes de la molécula forman una estructura de doble cadena de RNA unida por una sección de cadena sencilla. A este tipo de estructura le llamamos de tipo *tallo-asa* (figura 1). A esta molécula de RNA se le llama el precursor del microRNA (pre-microRNA), el cual posee múltiples burbujas y una serie de *missmatches* (zonas dentro de las regiones de doble cadena que no pueden unirse entre sí) (figura 1). El pre-microRNA es posteriormente exportado del núcleo al citoplasma por



**Figura 1.**

Vía del RNA de interferencia. Las dos vías de procesamiento se indican con los números 1 y 2. Los pasos de cada vía se señalan con letras. 1. Biogénesis de microRNA: a) procesamiento por *drosha* en el núcleo, b) exportación de la molécula pre-microRNA del núcleo al citoplasma por exportina-5, c) segundo procesamiento por *dicer*, d) identificación y desnaturalización del microRNA por miRISC, e) selección asimétrica de una de las cadenas del microRNA, f) apareamiento con el mRNA blanco y represión de la traducción. 2. Biogénesis de los siRNA: a) presencia de un RNA de doble cadena en el citoplasma, b) procesamiento por *dicer*, c) identificación del dúplex de 19 a 12 pares de bases por siRISC, d) selección asimétrica de una de las cadenas del dúplex, e) apareamiento con el RNAm blanco y subsiguiente degradación.

una vía que depende de la proteína exportina-5. Esta permite y regula el paso de moléculas entre el núcleo y el citoplasma. Ya en el citoplasma, el pre-microRNA es cortado hasta adquirir la estructura del microRNA maduro; es decir, una molécula de dsRNA lineal de entre 21 y 24 nucleótidos en donde de los extremos 5' sobresalen dos nucleótidos. Este último procesamiento es realizado, al igual que en el caso de los siRNA, por *dicer*. Los microRNA maduros se incorporan a un complejo ribonucleoproteínico (miRNP o miRISC) que es similar, y posiblemente idéntico, al siRISC. Una vez que estas moléculas de RNA se encuentran ensambladas en el miRISC, el complejo dirige el silenciamiento genético.

Una diferencia importante entre la vía de los siRNA y los microRNA es el mecanismo por el cual estas moléculas silencian la expresión de los genes. En general, los microRNA de animales reprimen la expresión genética bloqueando la traducción de los mRNA, esto es, evitando la síntesis de proteínas; en este caso el mRNA no es degradado, pero ya no se puede utilizar para fabricar proteínas. Otra diferencia importante radica en el hecho que el apareamiento entre el blanco y el microRNA no es perfecto.

### Para qué utilizan las células la interferencia de RNA

El mecanismo de interferencia está presente en todos los eucariotes en los que se ha buscado; esto sugiere que es un mecanismo muy antiguo que apareció temprano en la evolución y que tiene un papel importante en el mantenimiento del funcionamiento celular. Una de las ideas más aceptadas que explican su persistencia es que funciona como un sistema inmune a nivel celular. Es decir, que le permite a la célula distinguir información genética que le es propia, de la que no lo es, la cual actuaría como un parásito molecular, aprovechando la maquinaria celular para reproducirse y causando daño a la célula.

La información genética que puede estar en la célula y que pudiera actuar como un parásito molecular tiene dos fuentes, los llamados *elementos transponibles* y los *virus*. La mayor parte

de las familias de virus conocidos generan estructuras de dsRNA durante su replicación, las cuales pueden disparar el proceso de interferencia de RNA, que la célula utilizaría para destruir al RNA invasor.

Si la interferencia de RNA funcionara como un mecanismo de protección contra la infección por virus, se esperaría que se cumplieran tres condiciones. La primera es que el virus indujera la aparición de moléculas de siRNA dirigidas contra la secuencia del propio virus. La segunda condición es que cualquier bloqueo del mecanismo de interferencia favorecería la replicación del virus. Finalmente, sería de esperar que, si la interferencia de RNA fuera un mecanismo antiviral, los virus, a su vez, adquirieran durante la evolución mecanismos para combatir esta interferencia.

Las tres condiciones mencionadas con anterioridad se cumplen para el caso de plantas y de invertebrados. Sin embargo, en mamíferos no es claro el papel de la interferencia de RNA como un sistema de defensa antiviral que opere naturalmente. A pesar de esto, ha sido demostrado ampliamente que la maquinaria de la interferencia persiste en células de mamífero y puede ser utilizada como un mecanismo antiviral inducido exógenamente utilizando siRNA.

La segunda función importante que se reconoce al sistema de interferencia es la de regular la expresión de genes durante el desarrollo. Algunos de los ejemplos mejor estudiados fueron descubiertos estudiando *Arabidopsis thaliana*. En esta planta, cuando se pierde parcialmente el gen *dcl1* (el cual codifica para una de las proteínas *dicer*), se generan alteraciones en el desarrollo, que incluyen un florecimiento tardío, pérdida de sus meristemas y desregulación en sus células madres meristemáticas (el meristemo lo forman las células de la planta que le permiten seguir creciendo). La pérdida completa de este mismo gen en *C. elegans*, genera un defecto en el cambio de fase celular durante el desarrollo post-embriónico, generando un arresto embrionario, por lo que el nemátodo no puede completar su desarrollo. En ratones, al anular el gen que codifica para *dicer* se generan embriones sin células madre o troncales.

El número de genes que codifican para microRNA encontrados en diferentes animales varía de 0.5 a 1% del número total de genes en sus genomas. En el genoma del nematodo *Caenorhabditis elegans* y en el de la mosca de fruta *Drosophila melanogaster* se calcula que hay entre 100 y 140 genes para microRNA, mientras que los humanos tienen entre 200 y 255 genes. Al menos 0.2% de los genes en *Arabidopsis thaliana* codifican para microRNA. La representación relativa de los genes de microRNA (0.2-1%) es comparable a las familias de otros genes reguladores, tales como factores transcripcionales (el grupo de proteínas que se encarga de regular la transcripción de los genes). Casi el 30% de los microRNA son altamente conservados y tienen sus equivalentes en genomas de vertebrados e invertebrados. Esto pudiera sugerir que una fracción significativa posee funciones biológicas evolutivamente conservadas.

### La interferencia de RNA es un método eficiente para inhibir la expresión de genes

Una de las principales estrategias utilizadas en la investigación científica para el estudio de los distintos mecanismos celulares se denomina “pérdida de función”. Este concepto se refiere a la eliminación específica de la función de una proteína en la célula para después evaluar los cambios y así definir el papel que juega dicha proteína. Por ejemplo, si se tratara de una proteína que se requiere para promover la replicación celular, al anular su función encontraríamos que las células ya no se replican.

Esta estrategia ha sido extensamente utilizada desde hace tiempo. La anulación de la función se puede hacer de varias maneras. Una de las estrategias más antiguas es la de inducir un cambio (denominado *mutación*) en el gen que genera la proteína de interés; esta mutación debe ocasionar la pérdida de función de la proteína. Una segunda técnica es lo que denominamos “noquear el gen” (KO), en este caso el gen que genera la proteína de interés ya no es expresado en la célula. Estas estrategias

requieren de modificar la información a nivel del DNA, es decir, del gen. Regularmente estos enfoques requieren de entrenamiento especializado y de mucho trabajo.

La interferencia de RNA ha demostrado ser una herramienta muy eficiente para reducir la expresión de un gen. Además, resulta fácilmente utilizable por laboratorios sin experiencia previa. El diseño de los efectores de esta vía (siRNA o microRNA) está muy avanzado, existen sin costo los programas para su diseño, y la producción comercial de siRNA se ha extendido. Actualmente existen compañías que tienen disponibles siRNA contra virtualmente todo el genoma de algunos organismos (por ejemplo humano y ratón).

La interferencia de RNA 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; igualmente, en buscadores como Google hay más de dos y medio millones de entradas. Estos datos demuestran la importancia de esta herramienta, comparable con otras metodologías igualmente potentes como lo fue el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR. No es coincidencia que el premio Nobel de medicina 2006 fuera otorgado a los doctores Andrew Fire y Craig C. Mello, los que originalmente describieron que fragmentos de dsRNA tienen la capacidad de inhibir la expresión de genes.

### Estrategias para el uso efectivo de la interferencia de RNA

En general hay dos tipos de ensayos: los *transitorios*, donde la expresión del gen se interfiere sólo temporalmente) y los *estables* (las células o el organismo permanentemente interferidos). En el primer caso suelen utilizarse los siRNA sintetizados químicamente; para el segundo se requiere que la célula incorpore a su genoma los elementos necesarios para fabricar una molé-

cula de RNA de doble cadena que llegue hasta el citoplasma. Esto se logra a partir de vectores que producen shRNA (*small hairpin RNA*) o microRNA. Los shRNA son moléculas que forman una estructura del tipo tallo-asa (similar pero más sencilla que la de un microRNA), los cuales son procesados por *dicer* y forman siRNA. El uso de microRNA resulta muy eficiente porque se utilizan moléculas producidas naturalmente en la célula; de esta manera se genera un proceso de silenciamiento más eficaz. Cuando se utiliza microRNA es común que se ocupe una secuencia equivalente al pre-microRNA, en donde el tallo que formará el microRNA maduro es cambiado por la secuencia del gen que se desea interferir.

La síntesis de los siRNA puede hacerse por varias vías. En el caso de plantas e invertebrados, se pueden utilizar moléculas grandes de dsRNA (que serán procesadas a siRNA dentro de la célula). En vertebrados no se pueden utilizar moléculas de más de 30 pares de bases, por lo que es necesario producir directamente moléculas de siRNA o bien shRNA más cortos. La fuente más común es la síntesis química del dsRNA.

Si lo que se desea es utilizar shRNA o microRNA, entonces hay que seguir otra estrategia. Primero hay que fabricar un fragmento de DNA a partir del cual se pueda sintetizar el shRNA o miRNA. Regularmente se diseña para que se produzca una molécula de RNA que adoptará la estructura de tipo tallo-asa. Para poder introducirlo en la célula y que pueda producirse a partir de la maquinaria celular, se requiere de un vector. Regularmente este vector será un plásmido diseñado para este propósito. Una de las ventajas de esta estrategia es que se pueden seleccionar las células en las que este vector se integre al genoma de la célula; en este caso todas las células hijas tendrán integrado el vector y, por lo tanto, toda la población estará permanentemente silenciada.

Otro elemento importante a considerar es el mecanismo para introducir el siRNA o el vector. Aquí también hay diferencias fundamentales entre organismos. Por ejemplo, en insectos es posible simplemente sumergir al organismo en una solución con el dsRNA y éste penetrará

en la célula, ya que en los insectos existen transportadores de dsRNA (moléculas que permiten tomar el dsRNA del medio extracelular e introducirlos a la célula). En el caso del nematodo *C. elegans* se puede alimentar al gusano con bacterias que produzcan el dsRNA. Otra estrategia es la de microinyectar a la célula, sin embargo esta técnica es muy especializada (requiere de utilizar una aguja extremadamente delgada para inyectar el dsRNA al citoplasma celular). En los vertebrados la técnica más comúnmente utilizada es la de *transfectar* las células. La transfección consiste en introducir material genético al interior de una célula. La forma más comúnmente utilizada de transfección es la *lipofección* (transfectar utilizando lípidos). En el mercado existen una gran cantidad de lípidos que pueden utilizarse para introducir RNA o DNA. Una alternativa a la lipofección es el uso de vectores de origen viral que permitan introducir el shRNA a la célula blanco.

Tal y como podemos utilizar un plásmido como vector para la expresión del shRNA o el microRNA, también se puede utilizar un virus. A diferencia de la transfección, con un vector viral es posible alcanzar eficiencias del 100% (infectar todas las células). Se han desarrollado varios vectores virales, en particular derivados de adenovirus, retrovirus y lentivirus. Una segunda ventaja de los vectores virales es que pueden ser utilizados en organismos completos, lo cual es indispensable cuando se piensa en el potencial terapéutico de la interferencia de RNA.

### Genes en silencio: práctica experimental, una promesa para la medicina del futuro

Son múltiples las investigaciones en las que se utiliza la interferencia de RNA para establecer la función de un gen en particular. La otra gran aplicación está en el área de la medicina. En general, cualquier patógeno utiliza la maquinaria celular para replicarse; sin embargo, los elementos importantes para cada patógeno pueden ser particulares. Un enfoque interesante consiste en eliminar de la célula los elemen-

tos que son esenciales para el patógeno, ya sea virus, bacteria o parásito.

Otra aplicación es anular la función de proteínas que están involucradas en enfermedades humanas. En particular, el cáncer es uno de los padecimientos que podría llegar a ser tratado con interferencia de RNA. El principio del tratamiento se basa en el hecho de que las células cancerosas crecen constantemente; los productos de los genes que se requieren para este crecimiento podrían ser anulados con RNAi y así evitar el crecimiento de las células cancerosas.

Otro enfoque en la búsqueda de alternativas terapéuticas es el de interferir la expresión de genes de patógenos. En el caso de los virus, la lista de ejemplos en los que se ha utilizado la interferencia es amplia y crece continuamente. Se ha demostrado que es posible reducir la replicación de muchos de estos virus en la célula utilizando siRNA dirigidos contra el genoma viral.

El uso de la interferencia de RNA para combatir el cáncer o la infección de virus como el de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el de la hepatitis C (VHC) dependerá de dos elementos. El primero es elegir los blancos adecuados, y el segundo el direccionamiento e introducción del mediador de la interferencia (siRNA, shRNA o microRNA) a las células blanco adecuadas.

### Rotavirus: un problema de salud global

Los rotavirus son la causa más importante de gastroenteritis severas en infantes. Generalmente la enfermedad desaparece en el transcurso de unos cuantos días. Sin embargo, dado lo intenso de la deshidratación producida por las evacuaciones y el vómito, los niños pueden llegar a morir. En el mundo se calculan 600 000 muertes de infantes al año ocasionadas por estos virus.

Los virus infectan unas células muy especializadas localizadas en las puntas de las vellosidades del intestino delgado, llamadas *enterocitos* maduros. Estos enterocitos son las células encargadas de absorber los nutrientes que se encuentran en los alimentos que han pasado por nuestro tracto digestivo. Uno de los

efectos que tiene la infección de rotavirus es la destrucción de los enterocitos. Se ha sugerido que, al menos en parte, es por la destrucción de estas células que se produce la diarrea. No existen medicamentos para inhibir específicamente la replicación de rotavirus, por lo cual el tratamiento médico para los niños que han sido infectados y que presentan diarrea está más enfocado a evitar la deshidratación.

Los rotavirus se definen por una serie de características estructurales. Como primer particularidad son virus no envueltos (no tienen membrana lipídica rodeando a la partícula viral). Segundo, su genoma está compuesto por once moléculas independientes de RNA de doble cadena, cada una de las cuales representa un gen y codifica para una proteína (a cada una de estas moléculas le llamamos *segmento o gen*). Tercero, la partícula está formada por tres capas concéntricas de proteínas. La capa más interna se llama *core* (núcleo) y está formada principalmente por la proteína VP2. La capa intermedia está formada por la proteína VP6. La capa más externa está formada por dos proteínas, VP7 y VP4. A la partícula completa con las tres capas se le conoce como TLP (*triple-layered particle*).

### Silenciar el ciclo replicativo de rotavirus

Las primeras interacciones del virus con la célula hospedera involucran a las dos proteínas de superficie del virus, VP4 y VP7, así como al menos 5 moléculas celulares (receptores y co-receptores) diferentes, que están presentes en la superficie de la membrana plasmática de la célula. Como resultado de estas varias interacciones, la partícula viral entra a la célula a través de un mecanismo complejo, no bien caracterizado.

Durante el proceso de ingreso del virus a la célula, éste pierde la capa más externa de proteínas, generándose partículas conocidas como DLP (*double-layered particles*). Las DLP dirigen la síntesis de los mRNA del virus. Estos mRNA son utilizados por la célula para producir las proteínas del virus y también son la fuente a partir de la cual se produce el genoma para la descendencia del virus. Tanto las proteínas virales como el

RNA se acumulan en estructuras llamadas *viroplasmias*. El viroplasma es el lugar en donde se arman los virus, hasta generar DLP. La última capa del virus se adquiere en el retículo endoplásmico, cuando la DLP gema hacia el interior del retículo, y durante este proceso de maduración adquiere las proteínas VP4 y VP7, para convertirse así en una TLP. Finalmente, el virus destruye la célula, permitiendo que las nuevas TLP sean liberadas al medio extracelular en busca de una nueva célula para infectar y repetir el ciclo.

En el proceso de replicación e inducción de la muerte celular, es muy importante un conjunto de proteínas del virus que no están presentes en la partícula pero sí en la célula infectada. Este tipo de proteínas se conocen como proteínas no estructurales. En el caso de rotavirus hay seis de estas proteínas, denominadas NSP1 a NSP6. Cada una de estas proteínas se produce a partir de un segmento de RNA diferente (con excepción de NSP5 y NSP6 que se producen a partir del mismo segmento). Entender el papel de cada una de estas proteínas puede brindar nuevas oportunidades para buscar medicamentos que bloqueen la replicación del virus.

Uno de los enfoques que más se utiliza en la investigación con virus para determinar la función de sus proteínas, es el que llamamos genética reversa. Este enfoque se basa en generar mutaciones específicas en alguna parte de la información genética del virus. Posteriormente se reintroduce el gen modificado a partículas virales y se evalúa el efecto de las mutaciones introducidas sobre la capacidad del virus para replicarse. Sin embargo, este enfoque no había podido utilizarse en el caso de los rotavirus, donde es muy difícil conseguir que las mutaciones que se generan en su información genética puedan ser incorporadas en el virus (sólo hasta hace muy poco tiempo se ha reportado un método para lograrlo, pero que funciona de manera muy ineficiente).

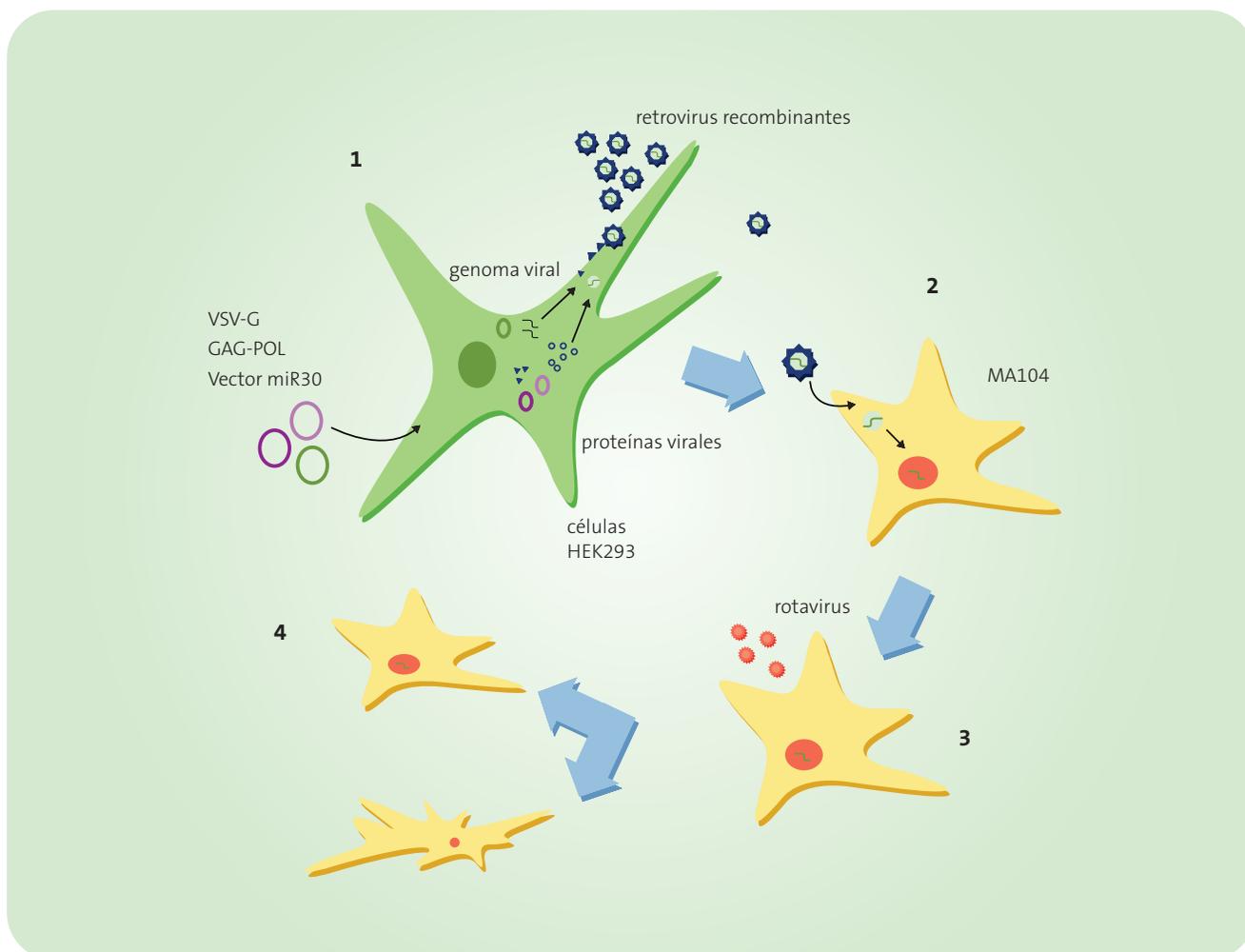
Dada la dificultad para realizar genética reversa en rotavirus, en nuestro grupo hemos enfocado la atención en la interferencia de RNA, la cual es una estrategia con tremendo potencial para estudiar la función de proteínas

a través de generar la pérdida de su función. Nuestro grupo fue el primero en demostrar que la interferencia de RNA es aplicable para anular la expresión de genes de rotavirus. Gracias a esta nueva herramienta, hemos podido descubrir y confirmar múltiples actividades de las proteínas de este virus. La caracterización de la función de la proteína VP4 fue la primera que abordamos utilizando la interferencia. Observamos que al interferir la expresión del gen de VP4, las partículas fueron capaces de madurar hasta el último paso, esto es, el de perder la envoltura de lípidos, adquiriendo la tercer capa de proteínas, aunque en este caso, al no expresarse VP4, sólo se ensambló VP7. Por otro lado, la inhibición de la síntesis de VP7 por interferencia resultó en la acumulación de partículas envueltas con lípidos en el interior del retículo endoplásmico, sugiriendo que VP7 es la responsable de la pérdida de esta envoltura durante el proceso de morfogénesis del virus.

### Una visión global de la biología de rotavirus utilizando interferencia de RNA

Al conjunto de genes de un organismo le llamamos genoma, y genómica a la ciencia que estudia los genomas de los diferentes organismos. Es una ciencia reciente con variedad de enfoques para estudiar cómo, dónde y cuándo se expresa la información del genoma, cómo interaccionan los productos de la información genética entre ellos y en qué procesos biológicos están involucrados. La disponibilidad de la información genética en muchos organismos ha permitido el desarrollo de herramientas genómicas que permiten el manejo de grandes cantidades de datos para el estudio de los sistemas celulares. Actualmente, la utilización de este tipo de estrategias en el estudio de la biología de sistemas se ha utilizado para indagar fenómenos biológicos en varios organismos, como levaduras, gusanos, moscas y mamíferos.

Dentro de las preguntas que pretende contestar la genómica, una de las que más interesa es la de la función de los genes. Cuando



**Figura 2.**  
 Diseño experimental. 1) Empaquetamiento del plásmido miR30 en partículas retrovirales utilizando células HEK293. 2) Transducción de células MA104, modelo de célula hospedera, con los retrovirus recombinantes. 3) Infección con rotavirus de las células transformadas. 4) Selección de células resistentes a la infección por rotavirus.

Categoría funcional	Genes totales	Diseños totales	3 shRNA	1-2 shRNA
Cinasas	741	4088	675	66
Fosfatasas	69	227	59	10
Ciclo celular	483	1716	363	120
Señal de transducción	2200	7147	1470	730
GPCR	544	1681	360	184
Apoptosis	503	1644	333	170
Metabolismo de ADN	252	839	189	63
Proteólisis	249	709	172	77
Factores transcripcionales	616	1604	329	287
Proteasas	360	958	201	159

Tomado de Paddison *et al.*, en *Nature* 428:427, 2006.

se utilizan enfoques genómicos para estudiar la función de los genes, decimos que se está haciendo genómica funcional. La gran eficiencia y especificidad que tiene la interferencia de RNA para anular la expresión de los genes, ha desembocado en el desarrollo de procedimientos que permitan la aplicación de esta técnica a gran escala; es decir, se puede interferir la expresión de genomas completos. Por ello, la principal estrategia para hacer genómica funcional es justamente la interferencia de RNA.

El primer paso para poder interferir un genoma es tener la secuencia de ese genoma. Posteriormente se requiere de tener los mediadores de la interferencia para cada uno de los genes del genoma (estos mediadores serán siRNA, shRNA o microRNA). Al conjunto de estos mediadores de interferencia le denominamos *bibliotecas*. Así, por ejemplo, podemos tener una biblioteca de siRNA para anular la expresión de cada uno de los genes del genoma de algún organismo. Finalmente, requerimos de un ensayo que nos permita preguntar por una función en particular. Los criterios para el diseño y la síntesis de estas bibliotecas son los mismos que describimos en secciones anteriores, y lo mismo aplica en cuanto a la selección del tipo de mediador de interferencia a elegir.

Cuando se utilizan bibliotecas de siRNA, es muy importante ensayar el efecto de cada siRNA por separado, ya que la inhibición es transitoria. Las bibliotecas se pueden construir también con plásmidos que expresen shRNA o microRNA. Una de las ventajas de usar este tipo de bibliotecas es que los plásmidos pueden integrarse al genoma de la célula de manera permanente, por lo cual se puede usar la biblioteca

con los elementos (shRNA) mezclados, y posteriormente, a través de un método de selección positivo, obtener las células con el fenotipo deseado. Múltiples investigaciones han demostrado que las secuencias de este tipo pueden ser usadas para estudios genéticos a gran escala en mamíferos y son una fuente viable para el análisis y descubrimiento de nuevas funciones de genes.

*In vitro*, los virus inducen alteraciones estructurales y funcionales en la célula hospedera; sin embargo, poco se sabe de los mecanismos moleculares de la respuesta celular a una infección viral. Un estudio sobre la variación en los niveles de expresión de genes celulares subsecuente a la infección por rotavirus, resultó en la identificación de 508 genes diferencialmente regulados; este análisis global describe un nuevo escenario en la respuesta celular a la infección por estos virus. Con el fin de identificar y caracterizar la función de genes celulares que participan en la infección por rotavirus, en nuestro laboratorio estamos utilizando una biblioteca de microRNA (miR-30) (figura 2) que contiene aproximadamente 231 000 secuencias verificadas contra 35 000 genes humanos. Ésta se encuentra clonada en el vector viral pMSCV y fue suministrada por el Dr. Stephen J. Elledge, del Departamento de Genética de la Escuela de Medicina en Harvard. En la siguiente tabla se presentan algunos de los genes representados en la biblioteca miR-30.

Con ayuda de esta biblioteca, podremos silenciar en ensayos individuales cada una de las proteínas celulares y descifrar cual de ellas participa en la replicación y proliferación del virus en la célula hospedera. ●