



Drogas Oligonucleotídicas: nuevas armas de la biología molecular contra los agentes infecciosos

Susana González Rico¹.

¹Microbióloga Instituto de Medicina Tropical “Félix Pifano C.”. Universidad Central de Venezuela. Ciudad Universitaria. Caracas, Venezuela.
gonzales@camelot.rect.ucv.ve

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Drogas, que interfieren con la acción de enzimas y proteínas esenciales del virus, bacteria o parásito, se han utilizado tradicionalmente como tratamiento contra los agentes infecciosos. Sin embargo, recientemente se han venido explorando nuevas alternativas, sobre la base de la biología molecular, que permiten interferir con la expresión de los genes que codifican estas proteínas. Estas nuevas drogas potenciales se fundamentan en el diseño de moléculas que interactúan de manera específica con los ácidos nucleicos de los patógenos, interfiriendo con la expresión de los mismos. En este trabajo revisaremos las principales opciones que están siendo estudiadas (triple hélices, ARN anti-sentido, interferencia por ARN, péptido ácido nucleicos, terapia de bacteriófagos, etc.), sus potenciales usos y sus limitaciones.

PALABRAS CLAVE: Drogas, Infecciones, Biología Molecular, Oligonucleótidos, Anti-sentido, Triple hélices, Bacteriófagos.

OLIGONUCLEOTIDE DRUGS: THE NEW WEAPONS OF THE MOLECULAR BIOLOGY AGAINST INFECTIOUS AGENTS

SUMMARY

Abstract In order to fight against infectious agents, we have traditionally used drugs that interfere with the function of essential enzymes and proteins of bacteria, virus and parasites. However, more recently new alternatives have been explored, based in molecular biology, that allows to interfere with the expression of the genes that code those proteins. These new potential drugs are based in the design of molecules that interact specifically with nucleic acids from the pathogen, interfering with its expression. In this work we will review the main options that are being explored (triplex DNA, antisense RNA, RNA interference, peptid nucleic acid, bacteriophage therapy, etc.), its potential uses and limitations

KEY WORDS: Drugs, Infections, Molecular Biology, Oligonucleotide, Anti-sense, Triplex DNA, Bacteriophage.

INTRODUCCIÓN

El dogma central de la biología específica que existe un patrón de transferencia de información a partir del ADN, que resulta finalmente en la síntesis de una proteína o polipéptido funcional. Los inhibidores tradicionales de las enzimas o factores de virulencia bacterianos funcionan mediante interacción con los productos polipeptídicos, pero todas y cada una de las moléculas involucradas en el patrón de transferencia de información que conduce a la síntesis, constituyen blancos potenciales para la intervención terapéutica. Por ejemplo, los procesos que resultan en la expresión de un gen, normalmente involucran la unión de ligandos (ARN polimerasa, ribosomas, ARN de transferencia, factores de transcripción, etc.) a secuencias específicas del ADN o ARN (promotores, operadores, codones, etc.). Si se usa este razonamiento podrían diseñarse moléculas artificiales específicas, que al interactuar con los ácidos nucleicos interfieran con la expresión génica. Esta posibilidad constituye un concepto muy atractivo en el diseño racional de drogas^{2,5}.

Entre los compuestos que pueden ser utilizados para regular artificialmente la expresión génica, los oligonucleótidos han despertado un interés particular. Los oligonucleótidos son pequeñas moléculas sintéticas de ácidos nucleicos, que tienen la capacidad de enlazarse con alta afinidad y especificidad a secuencias blanco en el ADN o ARN, mediante apareamiento de bases. En los últimos años, los oligonucleótidos han sido considerados como herramientas para alterar la expresión génica, básicamente a través de dos vías: por interferencia con la función de la molécula de ARN (como en el caso del ARN anti-sentido o las ribozimas), o de ADN (mediante la formación de triple hélices, o el uso de ligandos sintéticos que se unen al ADN). Para que estas estrategias sean efectivas, los oligonucleótidos deben cumplir con al menos seis criterios:

1. Poder ser sintetizados fácilmente y en grandes cantidades.
2. Ser estables in vivo.
3. Ser capaces de penetrar en la célula blanco.
4. Ser retenidos por la célula blanco.
5. Estar en capacidad de interactuar con el blanco intracelular.
6. No deben interactuar con otras macromoléculas de manera secuencia-inespecífica.

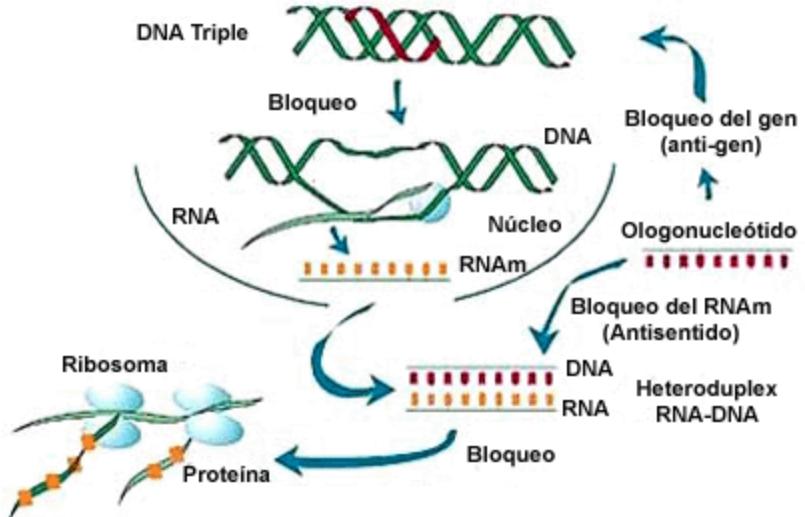


Figura 1
Posibles mecanismos de interferencia con la expresión génica

OLIGONUCLEÓTIDOS FORMADORES DE TRIPLE HÉLICES

La formación de una estructura compuesta de tres cadenas de ácido desoxiribonucleíco o triple hélice (triplex ADN) fue descrita por primera vez en 1957. Aunque en aquel momento se desconocían las implicaciones de este descubrimiento, este ha dado lugar a un nuevo campo de investigación de rápido crecimiento, enfocado al estudio de las aplicaciones terapéuticas del triple hélice ADN. Durante los últimos diez años, se ha logrado un enorme progreso en la optimización de la formación de triple hélice ADN, así como en la caracterización de estas moléculas. Dichos avances han contribuido al desarrollo de aplicaciones tales como la mutagénesis sitio, específica del ADN, y la inhibición transcripcional de genes de relevancia clínica.

Las triples hélices de ADN se forman cuando un oligonucleótido se une a una región de homopurinas del ADN blanco. Los oligonucleótidos formadores de triple hélices se unen de manera específica en la ranura mayor de la doble hélice de ADN, formando enlaces de hidrógeno tipo Hoogsteen o Hoogsteen reversos, con las bases de la cadena rica en purina. De acuerdo a la composición de bases y la orientación con la que se unen al ADN blanco, los oligonucleótidos pueden dar lugar a motivos pirimidínicos o purínicos^{7,8}.

- Los motivos pirimidínicos, se forman cuando un oligonucleótido compuesto por citosina y timina se une de forma paralela a la cadena rica en purinas del ADN, mediante enlaces Hoogsteen (Fig. 2). Las timinas (T) de la tercera cadena se unen a la adenina (A) en el par A:T, mientras que las citosinas protonadas (C+) se unen a la guanina (G) en el par C:G. Para que se genere una triple hélice pirimidínica, se requiere la protonación del N3 de las citosinas del oligonucleótido, lo cual ocurre sólo a pH ácido, por que este tipo de enlace no suele formarse en condiciones fisiológicas.
- El motivo purínico, en cambio, ocurre cuando un oligonucleótido se une de manera anti-paralela a la cadena de homopurinas mediante enlaces Hoogsteen reversos, y no requiere protonación de bases, por lo cual es básicamente independiente del pH. En este tipo de configuración se pueden formar tres tipos de enlaces: A de la tercera cadena puede unirse a un par A:T, G puede unirse a un par G:C y T a uno A:T.

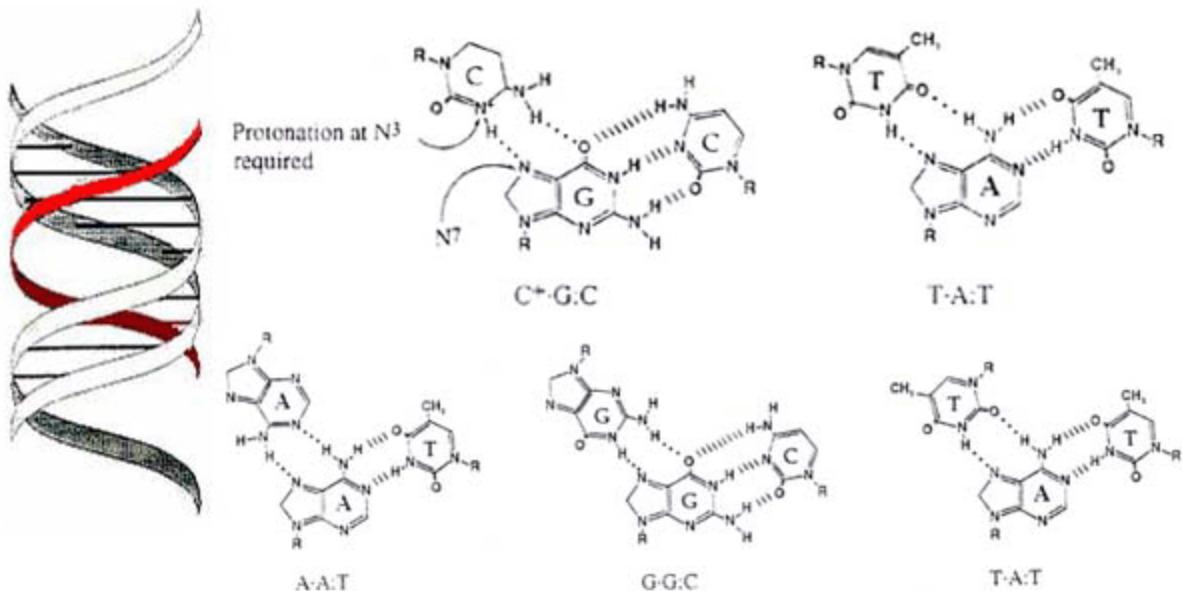


Figura 2
Esquema de la formación de las moléculas de triplex ADN

La formación de moléculas de triple hélice de ADN es altamente específica, pero no todas las secuencias de homopurinas se unen con la misma afinidad. Ciertas evidencias sugieren que la formación de triplex purínicos estables requiere que el oligonucleótido tenga un alto contenido de G (mas de 65%), mientras que en caso de los motivos pirimidínicos, la presencia de largas secuencias continuas de citosinas protonadas tienden a desestabilizar la formación del triplex. Tanto la longitud mínima requerida para la formación de la triple hélice (típicamente de 8 a 14 nucleótidos), como los efectos desestabilizantes de las bases no apareadas dependen en gran medida de las condiciones del experimento (temperatura, ambiente iónico favorable o desfavorable, pH, concentración de oligonucleótido). Las triples hélices son estabilizadas por cationes divalentes como el Mg²⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺, así como por poliaminas de origen natural como la espermina, espermidina y putrescina, los cuales actúan reduciendo las fuerzas electrostáticas repulsivas entre los fosfatos negativamente cargados de las tres cadenas. La cinética de la formación de triple hélice es aproximadamente dos órdenes de magnitud más lenta que la formación del dúplex. Bajo condiciones en las cuales el oligonucleótido esta en un exceso de 10 veces en relación a la cantidad de ADN blanco, la saturación de un sitio de homopurina en un plásmido requiere de más de ocho horas.

El uso de triplex ADN como herramienta en medicina molecular esta sujeto a la solución de algunos problemas que limitan actualmente su utilidad^{15,19}. Uno de ellos tiene que ver con la dificultad de hallar en el genoma secuencias de homopurinas lo suficientemente largas para formar triplex estables y la desestabilización causada por la presencia de bases no apareadas. Otra dificultad que debe ser superada en el caso de los motivos pirimidínicos, es la necesidad de protonación de la citosina. Por otro lado, los oligonucleótidos ricos en G tienen la tendencia a formar complejos intermoleculares en el motivo purílico. Pero quizás los problemas más importantes son aquellos inherentes al diseño de la terapia con oligonucleótidos, como son el transporte del agente al interior de la célula, la tasa de incorporación celular y su estabilidad.

Aún así el potencial de uso de los oligonucleótidos formadores de triplex es tan promisorio que varios grupos de investigación y compañías de tecnología han enfocado sus esfuerzos a la

solución de estos problemas, desarrollando ingeniosas estrategias para superar los obstáculos^{19, 23}. Por ejemplo, en relación a la compensación del efecto desestabilizante de las bases no apareadas, se han diseñado análogos con una menor sensibilidad al efecto disruptivo del desapareamiento, mediante modelaje molecular. Asimismo, se han usado "linkers" sin bases (1,2-dideoxy-D-ribosa) para "saltar" las bases no apareadas. En cuanto a la necesidad de protonación de la citosina en los motivos pirimidínicos, este puede ser solucionado mediante el uso de bases no naturales, las cuales mantienen las propiedades de puentes de hidrógeno de la citosina, pero no requieren protonación, como la 5-metilcitosina o 2'-O-methylpseudoisocytidina. En el caso de los motivos purínicos, el mayor inconveniente es la inestabilidad del triplex en presencia de concentraciones fisiológicas de cationes monovalentes, especialmente K⁺ y Na⁺, lo cual podría explicarse por la formación de dímeros y tetrámeros, o por el desplazamiento de cationes multivalentes más estabilizantes como el Mg²⁺ y el Ca²⁺. Con la finalidad de evitar este fenómeno, se han desarrollado análogos nucleotídicos, como el 7-deaza-2'deoxy-guanosina o el 2'-deoxy-6-tioguanosina, que contrarrestan este problema. Otra opción es reemplazar el esqueleto negativamente cargado del oligonucleótido por una cargado positivamente, obviando la necesidad de las sustancias catiónicas. Dentro de esta categoría destacan los oligonucleótidos fosforamidatos (con enlaces N,N-Dietil-etilendiamino fosforamidatos) y los morfolino pirimidinos¹⁶, ambos han sido estudiados con éxito. Finalmente, una alternativa válida para mejorar la estabilidad de la formación de triplex, consiste en acoplar a los oligonucleótidos, agentes inespecíficos de enlace a ADN. En este sistema los oligonucleótidos aportan la especificidad al sistema, mientras que el agente inespecífico contribuye a incrementar la estabilidad. Entre los agentes de "anclaje" que están siendo probados se encuentran agentes intercalantes como la acridina y el oxazolopiridocarbazol, poliaminas como la espermidina, agentes fotoreactivos como el psoralen, y agentes que estabilizan preferencialmente las triple hélices (en lugar de las doble hélices) como la 2,6-aminoantraquinona o el BePI²⁷.

La mayor parte de los trabajos de investigación realizados en los últimos años en el área, tienen que ver con mejorar la estabilidad y el transporte de los oligonucleótidos formadores de triplex al interior celular^{9,11}. Las estrategias usadas incluyen el acoplamiento de oligonucleótidos a policationes, tales como polilisina, el uso de conjugados ADN-transferrina/polilisina en presencia de la cápside de adenovirus de replicación deficiente, conjugación con péptidos fusogénicos, el uso de receptores específicos como el del folato o transferrina, conjugación a colesterol, y la más exitosa, la conjugación a lípidos catiónicos. Recientemente, se publicó un trabajo elaborado por Lewis et al., que reporta el uso de GS2888 citofectina para mejorar el transporte de oligonucleótidos y ADN al interior de células mamíferas. El compuesto es una formulación de un agente fusogénico con un novedoso lípido catiónico que tiene una cadena alquil de longitud optimizada. Este agente permite la transfección del ADN con alta eficiencia y baja toxicidad, y que retiene su actividad en presencia de suero. Una opción prometedora es la de generar los oligonucleótidos *in vivo*, eliminando el problema de la inmunogenicidad, la absorción celular, la variación de la dosis y el costo. Se ha propuesto utilizar un vector que permita la expresión constitutiva de oligonucleótidos, en diferentes tipos de células.

Los oligonucleótidos formadores de triple hélices tienen el potencial de funcionar como herramienta para la manipulación de la expresión génica, a través de su capacidad de unirse a un blanco de forma secuencia-específica. Esta propiedad ha sido usada en el diseño de varias

estrategias de interferencia génica, algunas de ellas de relevancia para aplicaciones clínicas. A continuación haremos referencia a algunos de los ejemplos más interesantes en este sentido.^{3,14}

- Interferencia sitio específica con proteínas de enlace a ADN. La estrategia más directa para crear represores génicos artificiales, es producir un complejo sitio-específico que inhiba la unión de factores de transcripción al promotor del gen blanco. Se ha demostrado que la formación de triple hélices cerca del promotor inhibe la unión de factores de transcripción tales como Spl, la T7 ARN polimerasa, el factor nuclear a, y el receptor de la progesterona, inhibiendo por lo tanto la transcripción. Esta estrategia ha sido utilizada para inhibir selectivamente un amplio rango de genes de importancia clínica *in vitro*: c-myc, Ha-ras, dihidrofolato reductasa, c-pim-1 murino, HER2/neu de rata, el factor de crecimiento epidermal humano, y el receptor de insulina de ratón. Los oligonucleótidos formadores de triplex pueden inhibir la transcripción de genes contenidos en construcciones transfectedadas en células mamíferas, como los promotores de los genes de colágeno al(I) y del receptor de andrógeno de rata, un gen de respuesta a progesterona, el gen inducible del interferón, el virus de la inmunodeficiencia humana, y el receptor de IL-2. Se ha demostrado también que el tratamiento de la célula con oligonucleótidos formadores de triplex puede dar lugar a la inhibición de la transcripción de genes endógenos, como el de aldehido deshidrogenasa, el receptor de IL-2, c-myc y el gen humano HER2/neu. En general, la inhibición depende de la dosis de oligonucleótido y se han alcanzado niveles de hasta 60% para algunos genes endógenos.
- "Tijeras moleculares" para cortar genes. Una de las herramientas empleadas inicialmente para estudiar la formación de triple hélices consistía en acoplar los oligonucleótidos a Fe-EDTA, un agente que corta el ADN en presencia de ditiotreitol. Estas "tijeras moleculares" han sido modificadas para ser utilizadas en reacciones biológicamente relevantes, como el mapeo de cromosomas. La necesidad de añadir un reactivo exógeno para catalizar la escisión hace poco viable el uso de este compuesto en células, pero otras opciones han sido estudiadas, y podrían conducir eventualmente al uso de estas sustancias para terapias antivirales y anticancerígenos.
- Abrazaderas oligonucleotídicas o "clamps". Muchos virus tienen genomas de cadenas sencillas de ADN o ARN, o atraviesan alguna forma de intermediario de ADN de cadena sencilla durante la replicación. Esto los hace sustratos ideales para agentes anti-replicativos tales como las abrazaderas oligonucleotídicas o "clamps". Las abrazaderas oligonucleotídicas son moléculas que se unen primero a una región de homopurinas u homopirimidinas en una cadena sencilla de ADN, mediante los clásicos enlaces de Watson-Crick, y luego se pliegan sobre sí mismas para que el otro extremo de la molécula forme una triple hélice. Estas estructuras son más estables que las formadas por las cadenas individuales. Las abrazaderas oligonucleotídicas pueden inhibir la elongación de la cadena durante la replicación *in vitro* del ADN mediante las ADN polimerasas T7, Taq y Vent.
- Mutagénesis y recombinación. Uno de los usos potenciales de los oligonucleótidos formadores de triplex, es su aplicación en el tratamiento de enfermedades que resultan de mutaciones. En este sentido, los oligonucleótidos pueden ser de utilidad para reemplazar los genes defectuosos con una copia del gen silvestre, así como para detener o disminuir la expresión de genes mutados, reparar genes mutados para producir proteínas funcionales o suplementar de manera exógena el producto génico deseado. Estos objetivos pueden

alcanzarse a través de dos estrategias: mediante mutagénesis sitio-dirigida, mediada por oligonucleótidos formadores de triplex, o a través de la recombinación inducida por triplex. En el primer caso, se aprovecha la especificidad derivada de la formación de triplex para hacer llegar un mutágeno a un sitio específico del ADN. Por ejemplo, se puede unir de manera covalente al oligonucleótido una sustancia como el psoralen, el cual es un mutágeno fotoreactivo bifuncional, que se intercala en el ADN y cuando es expuesto a radiación UV genera un enlace covalente entre las timinas de ambas cadenas. De esta manera, se pudieran reparar mutaciones puntuales o eliminar por completo (knock-out) ciertas funciones génicas en las células. Por otro lado, la inducción de recombinación mediante el uso de oligonucleótidos formadores de triplex, permitiría reemplazar fragmentos "grandes" de ADN. La recombinación homologa es un proceso bastante ineficiente, pero puede ser favorecido introduciendo cortes en las cadenas de ADN. Por lo tanto, el uso de oligonucleótidos formadores de triplex para generar daño al ADN de manera sitio específico, podría estimular potencialmente la recombinación homologa.

ARN ANTI-SENTIDO

La interferencia secuencia-específica con la función del ARN, mediante el uso de oligonucleótidos complementarios, fue propuesta por primera vez hace más de dos décadas. La tecnología de oligonucleótido anti-sentido utiliza moléculas de cadena sencilla de ARN o ADN para modular el metabolismo del mARN. Es la especificidad de la interacción de estos oligonucleótidos con las secuencias blanco, lo que hace que al menos en teoría, los oligonucleótidos anti-sentido puedan ser usados para atacar de forma específica un gen determinado. Varios mecanismos parecen estar involucrados en la modulación de la expresión génica mediada por oligonucleótidos anti-sentido²⁸. En primer lugar, los oligonucleótidos pueden unirse directamente al mARN y obstruir físicamente su traducción. Otro mecanismo de igual o mayor importancia parece ser la activación de la ARNasa H celular, la cual corta de manera específica el mARN en el dúplex ARN-ADN. Finalmente, el ARN anti-sentido puede también proveer el dúplex ARN-ARN necesario para la digestión por ARNasa L, la cual corta de manera preferencial ARN de cadena sencilla adyacente a dúplex de ARN. Mediante una combinación de estos mecanismos de acción, se espera que la tecnología anti-sentido pueda ser utilizada para inhibir no sólo la traducción del mARN, sino también otros procesos celulares esenciales que dependen del ARN, tales como la replicación.

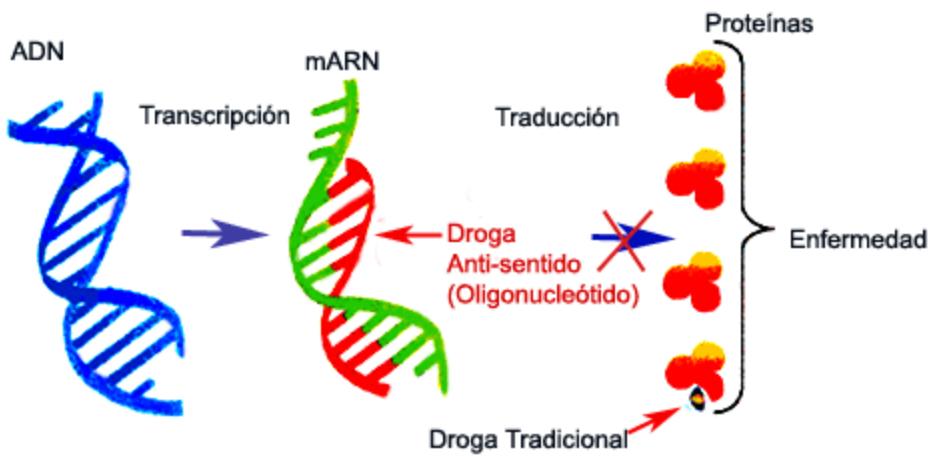


Figura 3

Esquema que muestra el funcionamiento de las drogas anti-sentido en comparación con las drogas tradicionales

Ciertos oligonucleótidos del tipo fosfodiester, sin modificaciones ulteriores, como los que ocurren en la naturaleza, han sido usados como drogas anti-sentido tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, estos son muy sensibles a las núcleaseas presentes en los fluidos biológicos, lo que limita su potencial terapéutico. Por ello, se han estudiado una serie de análogos modificados del esqueleto fosfodiester que incrementan la estabilidad de los oligonucleótidos. Entre estas modificaciones destacan los oligonucleótidos fosforotioatos (PS) y los oligonucleótidos metil fosfonates (MP), en los cuales uno de los átomos de oxígeno que no forman enlaces, son sustituidos por un grupo sulfuro o metilo, respectivamente.

Los oligonucleótidos PS han sido usados para inhibir la traducción de mARN de células mamíferas en cultivo. Los genes que han sido atacados incluyen *bcl-2*, *IL-1*, *ICAM-1*, *cmyc*, *c-myb*, *c-mos*, receptor de factor de crecimiento nervioso, receptor *IL-1*, *IL-2b*, *TGF-1* y *retinoblastoma-1*. Los oligonucleótidos PS, además de ser resistentes a las núcleaseas, son substratos de la ARNasa H, lo cual constituye una ventaja para su función, como se explicó con anterioridad, y además pueden formar complejos con el mARN blanco a 37°C. Por esta razón, estos han sido estudiados a nivel de modelos animales, y este tipo de drogas podrían ser de utilidad en un futuro cercano para el tratamiento de infecciones virales.

Por otro lado, los oligonucleótidos MP debido a su baja solubilidad, han sido menos exitosos. Sin embargo, se ha demostrado que actúan de forma secuencia-específica contra el virus del herpes y suprimen la traducción de un alelo mutado *Ha-ras* en fibroblastos NIH 3T3 transformados con *ras*, sin alterar el alelo silvestre. También han sido usados para disminuir la traducción de *c-myc* en un modelo animal.

La tecnología anti-sentido, a pesar de ser exitosa en muchos casos, ha demostrado ser altamente variable en su efectividad. Las causas se derivan probablemente de dos fuentes principales: En primer lugar, para que un oligonucleótido anti-sentido se una a su secuencia blanco, debe ser capaz primero de encontrar una secuencia accesible. La accesibilidad de la secuencia blanco es al menos en parte función de la estructura física del mARN, la cual a su vez está determinada por la composición interna de bases y las proteínas de la célula asociadas al ARN. Dado que es casi imposible predecir la estructura secundaria *in vivo* del ARN, el éxito de la tecnología anti-sentido es en parte un asunto de "suerte". El otro gran obstáculo para el uso de oligonucleótidos anti-sentido, al igual que sucede con los oligonucleótidos formadores de triplex, es la habilidad de

transportarlos al interior celular, de forma que puedan interactuar con la secuencia blanco. Los oligonucleótidos y sus derivados, son poli-aniones y como tales tienen poca o ninguna capacidad de difundir a través de las membranas plasmáticas, y son absorbidos por las células sólo a través de mecanismos dependientes de energía. Se piensa que la endocitosis mediada por receptores es el principal mecanismo de transporte de oligonucleótidos al interior celular. Cómo se discutió anteriormente, en el caso de los oligonucleótidos formadores de triplex, se han venido explorando una gran variedad de estrategias para solventar los problemas de absorción celular de estos compuestos, e incrementar la tasa a la cual atraviesan la membrana endosomal. Estas estrategias incluyen: el acoplamiento de oligonucleótidos a poli-cationes tales como la polilisina, el uso de conjugados ADN-transferrina/polilisina en presencia de la cápside de un adenovirus de replicación deficiente, la conjugación con péptidos fusogénicos, el uso de receptores específicos como el del folato o de la transferrina, la conjugación a colesterol, y la más exitosa que es la conjugación a lípidos cationicos. Una interesante opción es utilizar el rARN como vehículo para transportar otras actividades biológicas, tales como el ARN anti-sentido²⁶. Dado que el rARN es el ARN más abundante y estable en la célula, y que entra en contacto con todos los mARN que han sido traducidos, constituiría el vehículo ideal para favorecer la actividad de un ARN anti-sentido.

INTERFERENCIA POR ARN (ARNi)

Cómo hemos visto existen varias alternativas para silenciar genes mediante el uso de sistemas dependientes de la homología que funcionan en trans-. Entre estos destacan dos modalidades: en una de ellas la interferencia ocurre a través de procesos mediados por homología que afectan el templado, como son las moléculas anti-sentido y formadoras de triple hélices. En la otra modalidad, la transcripción del locus no se ve afectada, pero la vida media de las moléculas involucradas es modificada. Tal es el caso de la degradación post-transcripcional del ARN, mediante ribozimas. Recientemente, se ha demostrado que el ARN de doble cadena causa un silenciamiento génico de manera secuencia específica, en una gran variedad de organismos que incluyen nematodos, plantas, tripanosomas, drosófilas y planarias⁴. Aún en genes que son transcritos de manera abundante, unas cuantas moléculas de ARN por célula pueden producir inhibición específica, lo cual no puede ser explicado mediante un simple mecanismo de anti-sentido. La actividad sub-estequiométrica de la interferencia por ARN (o ARNi) ha llevado a la formulación de varios modelos: una primera opción explica que la interferencia involucra un mecanismo catalítico dependiente del ARN injectado; también es factible que el material introducido sea amplificado; y, por último, pudiese pensarse que la interferencia ocurre al nivel del gen¹⁰. Una de las hipótesis más atractivas es que el ARN exógeno puede dar origen a la degradación temprana del mARN endógeno, y es posible que exista una relación entre la capacidad del ARN de mediar la metilación del ADN, tal como se ha observado en plantas. La importancia de este fenómeno en términos fisiológicos no está clara, pero se piensa que pudiera jugar un importante papel en la modulación de la expresión génica.

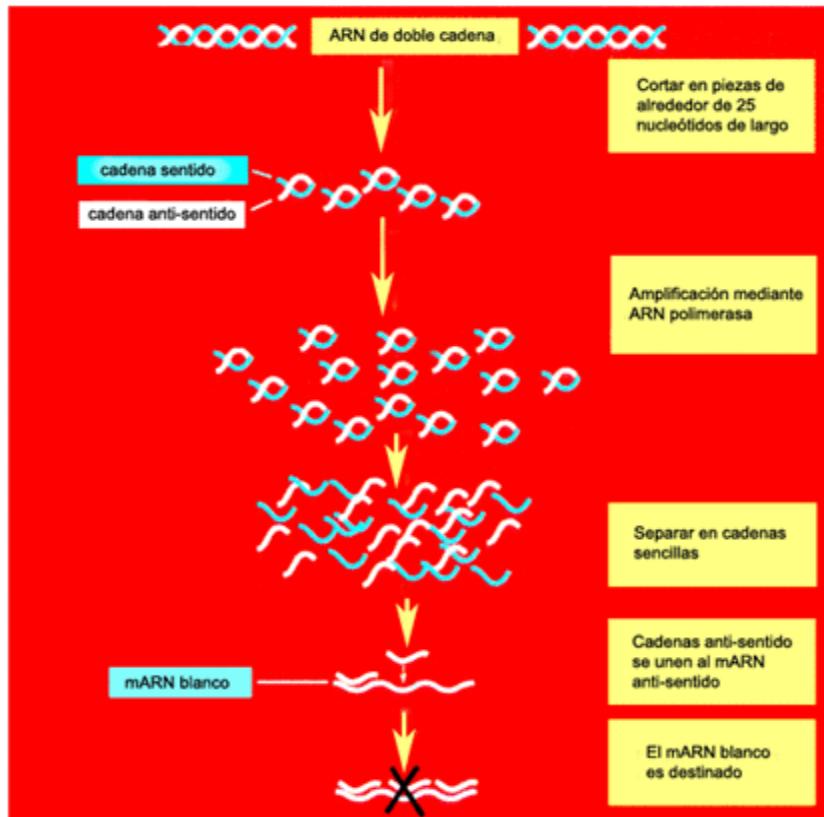


Figura 4
Mecanismo de acción de la interferencia por ARN

DEGRADACIÓN DE MARN POR RIBOZIMAS SECUENCIA-ESPECÍFICAS

La regulación génica ocurre a varios niveles, incluyendo la transcripción, la estabilidad del mARN, y la traducción. Otra forma de controlar la expresión génica es hacer que un mARN específico sea el blanco de la maquinaria de degradación. Una vez que un gen ha sido transcrita a ARN, ocurren una serie de eventos de procesamiento que llevan a la producción de un mARN maduro. La transferencia de información desde el mARN a la proteína puede ser bloqueada por oligonucleótidos anti-sentido o ribozimas. En 1982 varios laboratorios descubrieron que ciertas reacciones de splicing de ARN eran catalizadas por enzimas compuestas de ARN llamadas ribozimas. Las ribozimas incluyen los intrones del grupo I y grupo II, la sub-unidad ARN de la ARNsP, ribozimas de horquilla del virus de la hepatitis delta, ribozimas ribosomales y ribozimas de cabeza de martillo (o hammerhead). Las ribozimas, como los agentes anti-sentido, la acción consiste en la formación de pares de bases complementarias, pero ellas pueden también cortar el ARN blanco, dando lugar a su degradación. La ribozima hammerhead, fue descubierta en viroides y esta involucrada en el procesamiento de mensajes poli-cistrónicos. De forma natural actúa en cis durante la replicación viral, pero se puede producir una ribozima hammerhead que actúe en trans sobre otras moléculas de ARN. La ribozima hammerhead de acción trans consiste de secciones anti-sentido (denominadas "tallos" I y III) y un dominio catalítico con un tallo adyacente así como una sección en asa. La ribozima y su sustrato hibridizan a través de los tallos I y III. En teoría la ribozima hammerhead puede ser re-diseñada para cortar cualquier mARN. La especificidad del corte y su eficiencia viene determinada por los brazos de unión (tallos I y III). El corte es una reacción de trans-esterificación, en la cual reacciona el extremo 5'-hidroxil y el extremo 2',3'- fosfato cíclico en el sustrato nucleotídico. Esta es una de las enzimas ARN más pequeñas conocidas y pudiera tener utilidad en terapia génica, al cortar mARN que codifiquen

genes nocivos o esenciales para la supervivencia de ciertas células. Los blancos potenciales para la degradación mediada por ribozimas incluyen proteínas virales, reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción y proteínas de fusión aberrantes¹⁷.

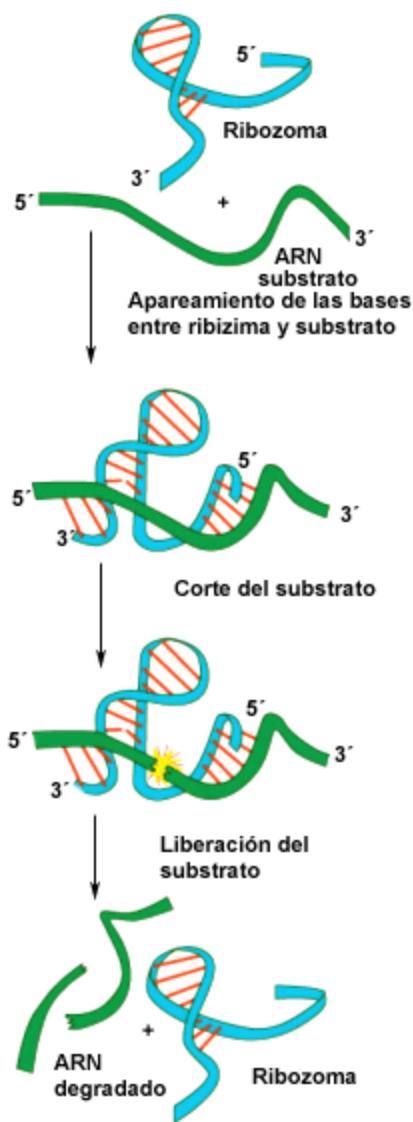


Figura 5
Mecanismo de acción de las ribozimas o ARN catalítico

El mayor reto para el uso de esta técnica *in vivo*, es mantener la eficiencia catalítica de las ribozimas en un ambiente celular donde ocurren complejas interacciones moleculares. El transporte de las ribozimas al interior celular puede realizarse de dos formas, por medios endógenos o exógenos. La estrategia endógena plantea la inserción del gen de la ribozima a continuación de un promotor en el genoma de la célula blanco. Esto requiere el uso de vectores retrovirales o adenovirales. El envío mediante métodos exógenos requiere el uso de ribozimas modificadas químicamente para hacerlas más resistentes a la degradación por núcleaseas. Por ejemplo, la síntesis de híbridos hammerhead ADN-ARN (también llamadas ribozimas químéricas), en la que algunos ribonucleótidos fuera del núcleo catalítico son reemplazados por 2'-desoxirribonucleótidos, resulta en una mayor resistencia a las núcleaseas y un incremento de 6 veces en la actividad catalítica de la misma. Las ribozimas a diferencia de los oligonucleótidos, no

pueden ser introducidas a las células mediante receptores, y el acoplamiento a colesterol o L-lisina no es eficiente puesto que las moléculas son posteriormente degradadas por las enzimas lisosomales. La opción más exitosa es la integración de la ribozima a la superficie de liposomas catiónicos, que permite la evasión de la endocitosis y, por tanto, de la degradación lisosomal.

PÉPTIDO-ÁCIDOS NUCLEICOS

Entre las modificaciones de los ácidos nucleicos que han venido siendo probadas destacan aquellas en las cuales las poliaminas reemplazan los fosfodiesteres, dando lugar a moléculas llamadas péptido-ácido nucleicos (PAN). En estas moléculas las mismas bases de los ácidos nucleicos se encuentran unidas aun esqueleto que se asemeja al de una proteína, y que esta formado por una cadena de unidades de glicina modificadas. Estas moléculas, además de formar dúplex con ARN, al igual que los oligonucleótidos anti-sentido, tienen la capacidad de formar triple hélices con el ADN, pero en lugar de alinearse con una doble hélice preexistente, el PAN forma un triplex estable que contiene dos cadenas de PAN y una de ADN [6,22]. La habilidad de los PAN se unirse tanto a ADN de doble cadena, como a ARN de cadena sencilla, significa que esta molécula tiene la capacidad de interferir con la actividad de un gen de distintas maneras. Pero la principal características que hace que el PAN sea tan atractivo como potencial medicina genética es que, no sólo se une con alta afinidad y especificidad de secuencia al blanco, sino que además son muy estables en el interior celular, puesto que el esqueleto peptídico les hace invulnerables al ataque por nucleaseas y proteasas^[13]. Además los oligómeros PAN pueden ser sintetizados en cantidades relativamente grandes con relativa facilidad. Existen problemas en relación al uso de estas moléculas como drogas, y la mayoría de los inconvenientes tienen que ver con como hacer llegar estas drogas a su sitio de acción, es decir al interior de la célula. Sin embargo, uno de los trabajos más promisorios en cuanto al uso de PAN como antibiótico anti-sentido, es el que reporta que moléculas de PAN diseñadas para atacar el ARN ribosomal, pueden inhibir la traducción (en un ensayo *in vitro*) y el crecimiento bacteriano. En los experimentos mostrados en ese trabajo^[12] PAN colocados en placas de petri fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, sugiriendo que estas moléculas tienen la capacidad de penetrar la pared celular de *E. coli*. En los últimos años también se ha demostrado que ciertos conjugados péptido-PAN son absorbidos de manera eficiente por al menos algunas células eucarióticas, y que usando estos conjugados se puede lograr la regulación por anti-sentido de genes blanco en células nerviosas.

Recientemente se publicó un trabajo^[29] en el que se discute la potencialidad de otro tipo análogo de ADN, denominado "locked nucleic acid" o LNA, como agentes anti-sentido. Estas nuevas moléculas son resistentes a la degradación por suero sanguíneo o extractos celulares, pero sensibles a la acción de ARNasa H, no tóxicos, y de potente actividad anti-sentido.

LIGANDOS NO OLIGONUCLEOTÍDICOS QUE INTERFIEREN CON LA EXPRESIÓN GÉNICA

El diseño de ligandos sintéticos que sean capaces de leer la información almacenada en la doble cadena de ADN ha sido por largo tiempo una de las metas de la química y biología. El diseño de moléculas pequeñas, que tengan la capacidad de permear las células y unirse de manera específica a una secuencia blanco de ADN predeterminada ofrece una alternativa potencial para

la regulación de la expresión génica tal como se ha venido discutiendo con los agentes anti-sentido y formadores de triple hélices. En los últimos años se han desarrollado reglas simples de apareamiento para la unión a la "grieta menor" del ADN de poliamidas que contienen los aminoácidos N-metilpirrol (Py) y N-metilimidazol (Im). Estas reglas permiten diseñar un nuevo tipo de pequeñas moléculas para reconocimiento de secuencias específicas en la doble hélice del ADN.

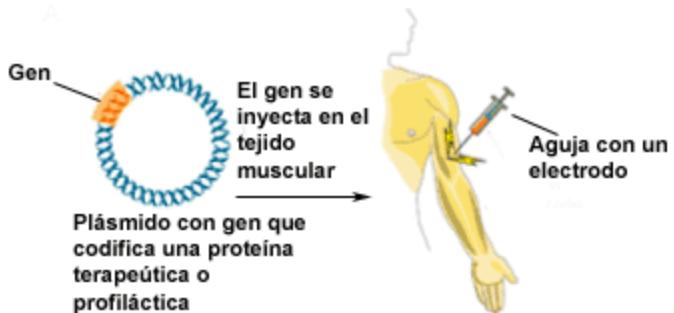
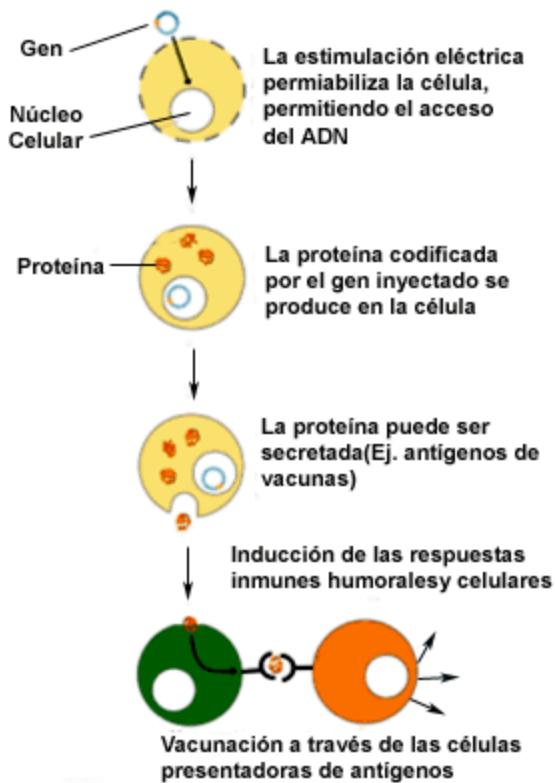
TERAPIA DE BACTERIÓFAGOS

El descubrimiento de los bacteriófagos hace más de 82 años, produjo un gran entusiasmo para su uso en profilaxis y terapia de enfermedades bacterianas. Sin embargo, el entusiasmo exagerado fue sustituido rápidamente por la desilusión, y muchos ensayos fueron simplemente olvidados al descubrirse los antibióticos. Por lo tanto, aunque los bacteriófagos han contribuido enormemente a nuestra comprensión de la genética y biología bacterial y viral, su uso en la terapia de enfermedades bacterianas ha sido nulo. En los años 80s un grupo demostró que tanto la profilaxis como el tratamiento de la infección con *E. coli* en animales de granja, era posible usando fagos en números menores que el inóculo bacteriano, indicando una rápida multiplicación de los fagos *in vivo*. El tratamiento de los animales infectados con fagos era generalmente más efectivo que el uso de antibióticos, incluyendo estreptomicina, tetraciclina, ampicilina y trimetropin/sulfafurazol. Las mutantes resistentes de la bacteria que emergen después del tratamiento eran no-cápsulados, y por lo tanto de considerable menor virulencia. En vista de los exitosos resultados obtenidos por en este trabajo, se empezó a estudiar el uso de terapia de fagos en infecciones bacterianas resistentes a antibióticos en humanos, especialmente en pacientes con heridas causadas por quemaduras. Un trabajo demostró que la destrucción de los injertos de piel de cerdo utilizados en el tratamiento de las quemaduras, por infección con *P. aeruginosa*, disminuía considerablemente cuando se aplicaba el fago. Una de las ventajas de los bacteriófagos en relación con los antibióticos resulta de su capacidad de replicarse, lo cual permite que una única dosis de fagos pueda ser suficiente para erradicar una infección, y aquellos fagos que no actúen sobre la infección, no podrán replicarse, por lo que su dosis será baja, permitiendo esto el uso de terapias combinadas. Otras ventajas incluyen, la especificidad de los fagos, su capacidad de atravesar la barrera sangre-cerebro, y el que los fagos, hasta donde se sabe, no son tóxicos. Una desventaja es que es muy probable que los fagos sean atacados por el sistema inmune, por lo cual las rondas sucesivas de tratamiento con fagos tenderán a ser menos eficientes, sin embargo es probable que este tipo de terapia sea usada para enfermedades en las cuales las infecciones agudas repetidas sean poco probables. Quizás una de las principales objeciones al uso de los fagos como terapia para enfermedades infecciosas, es lo limitado de su rango de acción. Esto podría ser un problema cuando empiecen a surgir cepas resistentes. Sin embargo, la flexibilidad del material fágico, hace suponer que sería relativamente sencillo adaptar el fago a la nueva cepa. En cualquier caso, las cepas responsables de un brote epidémico son generalmente clonales. Algunos fagos no causan la lisis de las células, sino que se insertan en el cromosoma, estos deberían ser evitados. En el caso de algunas infecciones, las bacterias viven principalmente en le interior celular, y por lo tanto es poco probable que estas terapias sean eficientes para el tratamiento de este tipo de infecciones. En términos generales la terapia con fagos tiene muchas probabilidades de ser exitosa siempre que

existen las condiciones que favorezcan la interacción del fago con la bacteria blanco, y su rápida dispersión y replicación.²⁰

LIGANDOS NO OLIGONUCLEOTÍDICOS QUE INTERFIEREN CON LA EXPRESIÓN GÉNICA VACUNACIÓN CON ADN

Uno de los mayores desarrollos de las ciencias médicas en los últimos años ha sido el desarrollo y uso extendido de vacunas contra agentes infecciosos. Sin embargo aun quedan algunas infecciones que han permanecido inmunes a la protección mediada por vacunas, entre ellas, *Mycobacterium tuberculosis*, el parásito de la malaria y *Leishmania major*, probablemente porque la respuesta contra este tipo de infecciones es mayormente celular y no humoral. Todas las vacunas utilizadas hasta los momentos estimulan la producción de anticuerpos, mientras que sólo aquellas que utilizan organismos vivos atenuados producen una respuesta inmune celular. Dichas vacunas sin embargo no son apropiadas para uso en humanos, por lo que en los últimos años se ha venido trabajando arduamente en el desarrollo de las llamadas vacunas de ADN o ADN “desnudo”^{21,18}. En una vacuna de ADN, el gen que codifica el antígeno de interés es clonado en un plásmido bacteriano, el cual ha sido manipulado para permitir una mayor expresión de dicho gen en células mamíferas. Al ser inyectado en el animal, el plásmido entra en las células hospedadoras, donde permanece en el núcleo como episoma, es decir, no se integra al ADN de la célula. Usando la maquinaria metabólica de la célula, el plásmido dirige la síntesis del antígeno que codifica.

A**B****Figura 6**

Esquema que muestra el funcionamiento de las vacunas de ADN

La síntesis de antígenos en el interior celular tiene varias ventajas sobre la inmunización con material exógeno (tal como proteínas recombinantes u organismos atenuados). La proteína producida por el plásmido probablemente se plegara en su forma nativa, lo cual favorece la producción de antígenos neutralizantes. Además, los péptidos sintetizados bajo la dirección del plásmido pueden ser transportados a la superficie celular y ser presentados por las moléculas HLA clase I, estimulando la producción de células T citotóxicas. Aún más, los plásmidos contienen secuencias nucleotídicas inmuno-estimulantes (citidina fosfato guanosina (CpG) sin metilar), y se ha reportado que estas vacunas persisten y son capaces de estimular sostenidamente la respuesta inmune en ratones. Por supuesto este método también tiene limitaciones, muchas de ellas en referencia a la seguridad de las mismas. Una de las limitaciones teóricas más importante tiene que ver con la posibilidad de que las células "transfectadas" sean eliminadas, por la respuesta citotóxica que es activada por las mismas. Pero lo cierto es que, al menos en ratones, las vacunas de ADN han demostrado que pueden inducir una respuesta inmune protectora, mediada por células, contra *L.major*, *M. tuberculosis* y malaria. En humanos los resultados de los ensayos de vacunas de ADN son muy interesantes, y parecen demostrar que es factible inducir

una respuesta inmune mediada por células con el uso de ADN desnudo, si bien no necesariamente esto implica protección²⁵.

REFERENCIAS

1. Bentin T, Nielsen PE. In vitro transcription of a torsionally constrained template. *Nucleic Acids Res.* 2002 Feb 1;30(3):803-9.
2. Bunnell BA, Morgan RA. Gene therapy for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jan;11(1):42-56.
3. Chan PP, Glazer PM. Triplex DNA: fundamentals, advances, and potential applications for gene therapy.
4. Cottrell TR, Doering TL. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends Microbiol.* 2003 Jan; 11(1):37-43.
5. Dagle JM, Weeks DL. Oligonucleotide-based strategies to reduce gene expression. *Differentiation.* 2001 Dec;69(2-3):75-82.
6. Demidov VV, Frank-Kamenetskii MD. Sequence-specific targeting of duplex DNA by peptide nucleic acids via triplex strand invasion. *Methods.* 2001 Feb;23(2):108-22.
7. Diviacco S, Rapozzi V, Xodo L, Helene C, Quadrifoglio F, Giovannangeli C. Site-directed inhibition of DNA replication by triple helix formation. *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2660-8.
8. Duval-Valentin G, Thuong NT, Helene C. Specific inhibition of transcription by triple helix-forming oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 15;89(2):504-8.
9. Faria M, Giovannangeli C. Triplex-forming molecules: from concepts to applications. *J Gene Med.* 2001 Jul-Aug;3(4):299-310.
10. Fjose A, Ellingsen S, Wargelius A, Seo HC. RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnol Annu Rev.* 2001; 7:31-57.
11. Giovannangeli C, Helene C. Triplex technology takes off. *Nat Biotechnol.* 2000 Dec;18(12):1245-6.
12. Good L, Nielsen PE. Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3; 95(5):2073-6.
13. Good L, Nielsen PE. Peptide nucleic acid (PNA) antisense effects in *Escherichia coli*. *Curr Issues Mol Biol.* 1999;1(1-2):111-6.
14. Gowers DM, Fox KR. Towards mixed sequence recognition by triple helix formation. *Nucleic Acids Res.* 1999 Apr 1;27(7):1569-77. *J Mol Med.* 1997 Apr;75(4):267-82.
15. Kochetkova M, Shannon MF. Triplex-forming oligonucleotides and their use in the analysis of gene transcription. *Methods Mol Biol.* 2000;130:189-201.
16. Lacroix L, Arimondo PB, Takasugi M, Helene C, Mergny JL. Pyrimidine morpholino oligonucleotides form a stable triple helix in the absence of magnesium ions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Apr 13;270(2):363-9.
17. Lavrovsky Y, Chen S, Roy AK. Therapeutic potential and mechanism of action of oligonucleotides and ribozymes. *Biochem Mol Med.* 1997 Oct;62(1):11-22.
18. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Intern Med.* 2003 Apr;253(4):402-10.
19. Majumdar A, Khorlin A, Dyatkina N, Lin FL, Powell J, Liu J, Fei Z, Khripine Y, Watanabe KA, George J, Glazer PM, Seidman MM. Targeted gene knockout mediated by triple helix forming oligonucleotides. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):212-4.
20. Merril CR, Scholl D, Adhya SL. Timeline: The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Jun;2(6):489-97.

21. Molling K. Naked DNA for vaccine or therapy. *J Mol Med.* 1997 Apr;75(4):242-6.
22. Nielsen PE, Egholm M. An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol.* 1999;1(1-2):89-104.
23. Praseuth D, Guiyesse AL, Helene C. Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 10;1489(1):181-206.
24. Shuey DJ, McCallus DE, Giordano T. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. *Drug Discov Today.* 2002 Oct 15; 7(20):1040-6.
25. Strugnell RA, Drew D, Mercieca J, DiNatale S, Firez N, Dunstan SJ, Simmons CP, Vadolas J. DNA vaccines for bacterial infections. *Immunol Cell Biol.* 1997 Aug;75(4):364-9.
26. Sweeney R, Fan Q, Yao MC. Antisense ribosomes: rRNA as a vehicle for antisense RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 6;93(16):8518-23.
27. Vasquez KM, Glazer PM. Triplex-forming oligonucleotides: principles and applications. *Q Rev Biophys.* 2002 Feb;35(1):89-107.
28. Wagner EG, Simons RW. Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:713-42.
29. Wahlestedt C, Salmi P, Good L, Kela J, Johnsson T, Hokfelt T, Broberger C, Porreca F, Lai J, Ren K, Ossipov M, Koshkin A, Jakobsen N, Skouv J, Oerum H, Jacobsen MH, Wengel J. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5633-8.