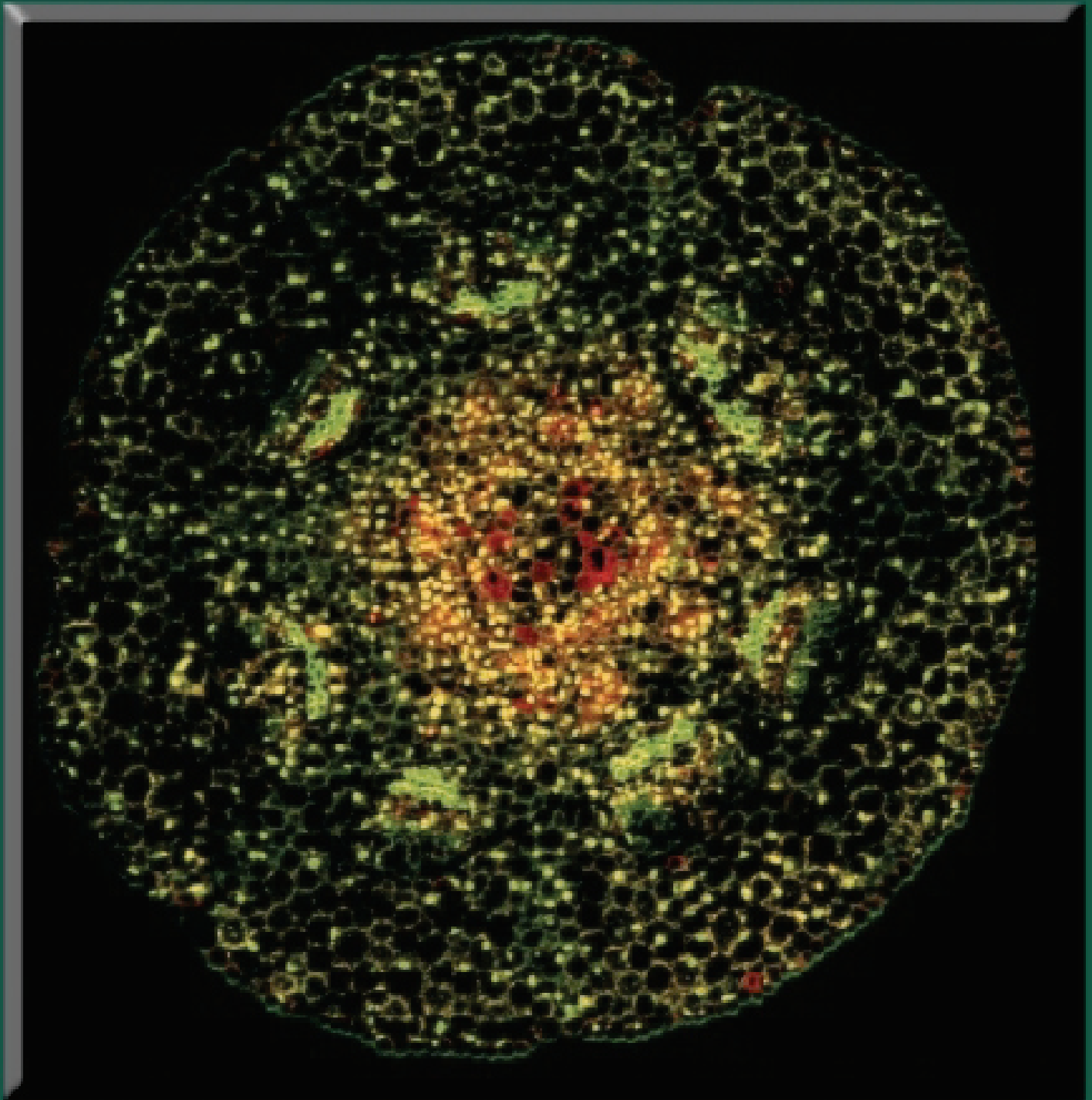


Encuentros en la Biología



Director:
Salvador Guirado

Editor jefe:
M. Gonzalo Claros

Comité editorial:
Ramón Muñoz-Chápuli,
Antonio de Vicente,
José Carlos Dávila,
Francisco Cánovas,
Francisca Sánchez

Diseño de la portada:
M. Gonzalo Claros

Correspondencia a:
Encuentros en la Biología,
M. Gonzalo Claros (Editor jefe),
Depto. Biología Molecular y Bioquímica,
Facultad de Ciencias,
29071 Málaga
Tfno.: 952 13 7284
email: claros@uma.es

Dirección de internet:
<http://www.encuentros.uma.es/>

Editado con la financiación del
Vicerrectorado de Investigación y
Doctorado de la Universidad de Málaga.

D.L.:MA-1.133/94

ÍNDICE

3 **Cómo ver la PCR en directo: la RT-PCR**

Sara Díaz Moreno

4 **Factores que regulan el desarrollo folicular II: folículos antrales**

*José Antonio Velázquez Domínguez y
Enrique Mendieta Márquez*

6 **RNAi: la revolución silenciosa**

Alejandro Ruiz Moreno y Ramón Muñoz-Chápuli

Portada: imagen de epifluorescencia de los cotiledones de *Pinus sylvestris* teñidos con anaranjado de acridina (Foto: M^a Fernanda Suárez, Dpto Biología Molecular y Bioquímica, UMA)

Instrucciones para los autores

La revista Encuentros en la Biología es una publicación mensual durante el curso académico español que pretende difundir, de forma amena y accesible, las últimas novedades científicas que puedan interesar tanto a estudiantes como a profesores de todas las áreas de la biología. Además de la versión impresa, la revista también se puede consultar en línea en <http://www.encuentros.uma.es/>. Cualquier persona puede publicar en ella siempre que cumpla las siguientes normas a la hora de elaborar sus originales:

1. Todos los manuscritos deberán ser inéditos o contarán con la autorización expresa del organismo que posea los derechos de reproducción. Además, deben tener alguna relación el objetivo de la revista —los que simplemente reflejen opiniones se rechazarán directamente—.
2. El formato del documento puede ser RTF, SXW (OpenOffice), DOC (Microsoft Word) o ABW (AbiWord). Debido a las restricciones de espacio, la extensión de los mismos no debe superar las 1600 palabras; en caso contrario, el editor se reserva el derecho de dividirlo en varias partes que aparecerán en números distintos.
3. Cada contribución constará de un título, autor o autores, y su filiación (situación académica; institución u organismo de afiliación; dirección postal completa; correo electrónico; teléfono). Para diferenciar la afiliación de diferentes autores utilice símbolos (*, #, ¶, †, ‡) después del nombre de cada autor.
4. Los nombres de las proteínas se escribirán en mayúsculas y redondilla (ABC o Abc). Los de los genes y las especies aparecerán en cursiva (*ABC*, *Homo sapiens*). También se pondrán en cursiva aquellos términos que se citen en un idioma que no sea el castellano.
5. Las tablas, figuras, dibujos y demás elementos gráficos serán en blanco y negro puros, y deberán ir colocados en su posición, dentro del archivo. Las figuras, las fórmulas y las tablas deberán enviarse en formato GIF o JPG, a una resolución mínima de 150 dpi, máxima de 300 dpi y al menos 8 bits de profundidad.
6. Cuando sean necesarias, las referencias bibliográficas se citarán entre paréntesis dentro del propio texto indicando el apellido del primer autor (se escribirá «y cols» en caso de ser más), el año, la revista o libro donde aparece, el volumen y las páginas.
7. Envío de contribuciones: el original se enviará por correo electrónico al editor jefe (claros@uma.es) o a cualquier otro miembro del comité editorial que consideren más afín al contenido de su contribución. Aunque lo desaconsejamos, también se pueden enviar por correo ordinario (Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España) acompañados de un disquete o CD. No se devolverá ningún original a los autores.
8. Los trabajos serán leídos al menos por un editor y/o un revisor externo para asesorar sobre la conveniencia de publicar el trabajo; también se podrán sugerir al autor las mejoras formales o de contenido que harían el artículo más aprovechable. En menos de 30 días se enviará la notificación al autor por correo electrónico.

CÓMO VER LA PCR EN DIRECTO: LA RT-PCR

Sara Díaz Moreno

Becaria de investigación, Dpto Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga

La reacción en cadena de la polimerasa en directo («en tiempo real») (RT-PCR) es un método que permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. Está basada en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. Esto permite la visualización en directo del perfil completo de amplificación de la diana dentro de un amplio rango de magnitud. El análisis de la curva de fusión del producto, posibilita además la caracterización del fragmento amplificado por su temperatura de fusión (T_m).

Esta técnica ofrece una gran cantidad de aplicaciones al ser capaz de cuantificar de manera absoluta o relativa moléculas molde de DNA o RNA. De este modo, la RT-PCR cuantitativa se usa para determinar la carga vírica, el título de gérmenes y contaminantes en la comida, sangre u otro tipo de muestras, la expresión génica en distintos tejidos, tratamientos o estadios del desarrollo, la discriminación alélica, y la delección o el grado de amplificación de los genes. Además, la RT-PCR tiene aplicaciones clínicas muy importantes, como el diagnóstico de tumores, la respuesta a medicamentos en cánceres humanos y el perfil de citocinas en la respuesta inmune. También el genotipado de muestras se puede realizar a través de la cuantificación y diferenciación de alelos y la detección de polimorfismos, llegando incluso a detectar los SNP (polimorfismos mononucleotídicos, del inglés *single nucleotide polymorphism*). Por último, la validación de los resultados de experimentos con microordenamientos (*microarray*) de DNA se suele realizar mediante RT-PCR.

Para llevar a cabo estas aplicaciones se necesita un termociclador con capacidad para detectar y medir la fluorescencia. La exactitud y la precisión de los aparatos de RT-PCR se ven afectadas, en gran medida, por la razón señal:ruido, la cual depende del formato de detección (fluoróforos) y de la calidad del sistema óptico. Otro parámetro a tener en cuenta es la homogeneidad de la temperatura dentro del instrumento, ya que la menor desviación de la temperatura llevaría a una cuantificación errónea.

Existen además gran variedad de formatos de detección (figura 1). La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto de la PCR y la generan los fluoróforos específicos de DNA bicatenario o las sondas fluorescente específicas de la secuencia.

El SYBR-Green I (figura 1a) es el fluoróforo específico de DNA bicatenario más usado en la RT-PCR. Este fluoróforo se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. La detección con SYBR-Green I es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula. Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos

que luego el fluoróforo detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados.

Para detectar específicamente una secuencia se utilizan sondas de oligonucleotidos etiquetadas con fluoróforos. La intensidad de la señal se relaciona con la cantidad de producto de PCR de dos formas: a) una disminución del amortiguamiento de la fluorescencia dependiente de producto, en la que el fluoróforo (la molécula deladora) y el amortiguador (*quencher*) se separan al unirse la sonda a la diana (figura 1c, d, e, f); b) un incremento de la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET) del donador al fluoróforo aceptor al quedar cercanos cuando se une la sonda a la diana (figura 1b).

El SYBR-Green I produce resultados muy precisos en la cuantificación del producto. Por otra parte, las sondas específicas de secuencia facilitan la identificación de mutaciones y permiten realizar múltiples experimentos simultáneamente al poder utilizar varias sondas con fluoróforos distintos a la vez.

Para el análisis cuantitativo del producto, se analiza la curva de amplificación, la cual está constituida por al menos tres fases distintas: 1) fase de latencia (*lag*) donde la acumulación de producto no se puede detectar, 2) fase exponencial y 3) fase de saturación.

El número de copias de la diana al inicio de la reacción se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (C_t). El C_t es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente

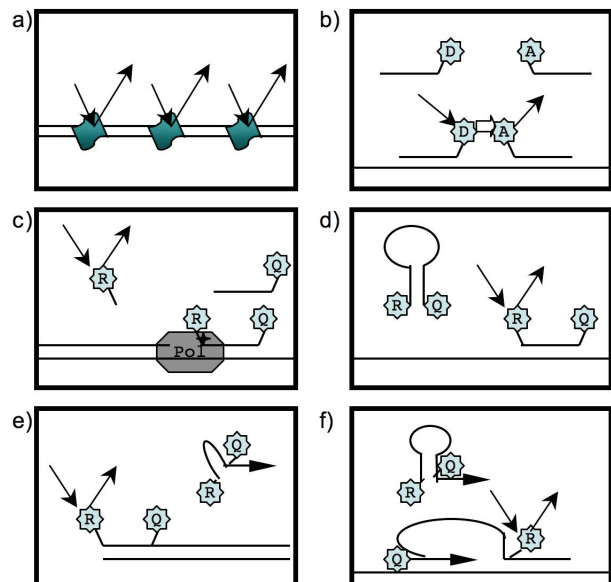


FIGURA 1: Formatos de detección. D, donador; A: aceptor; R, delador (fluoróforo); Q, amortiguador. a) SYBR-Green I; b) sondas de hibridación; c) sondas «taqman»; d) balizas moleculares; e) sondas «Sunrise»; f) sondas escorpión

proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. De esta manera, utilizando muestras patrones que contienen diluciones seriadas de concentraciones conocidas de la diana, se construye una recta de calibración que relaciona los Ct con el logaritmo de la cantidad inicial de molde (N_0). Extrapolando en esta recta los Ct obtenidos para las muestras problema, se puede estimar el valor de sus N_0 .

La eficiencia de la reacción también se puede calcular a partir de los Ct de los patrones. Para lograr una cuantificación correcta, la eficiencia de patrones y muestras problema deben ser iguales, lo que implica una puesta a punto previa de la PCR.

En caso de conocer la concentración absoluta de moléculas de molde en los patrones, los resultados serán absolutos. Pero la cuantificación absoluta no siempre es necesaria. Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión en los tratamientos a analizar, normalmente un gen de mantenimiento (*housekeeping*). Comparando los Ct del gen de referencia con el gen problema en muestras tratadas y sin tratar, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema.

Otro resultado a analizar es la curva de fusión del producto. Ésta se obtiene tras la amplificación y se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de

temperatura del producto.

La curva de fusión se puede obtener con los fluoróforos con afinidad por el DNA bicatenario como el SYBR-Green I, y con sondas específicas de secuencia que no se hidrolizan durante la reacción ni queden integradas en el producto, como las balizas moleculares (*molecular beacons*) y las sondas de hibridación.

La derivada de la curva de fusión nos revela un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto. Cuando se utiliza el SYBR-Green I se puede confirmar la amplificación de la diana específica a través de este análisis, ya que cuando se obtienen varios productos se detectan varios picos con T_m y ABC diferentes. De este modo también, la utilización de este fluoróforo sirve para caracterizar el producto. Por otra parte, el uso de sondas específicas de secuencia nos revela una curva de fusión que sirve, principalmente, para genotipar y buscar los SNP, y para detectar mutaciones.

Por todo ello, la RT-PCR tiene aplicaciones en numerosos campos (medicina forense, diagnóstico clínico, control alimentario, análisis de organismos modificados genéticamente...) que continúan ampliándose. Esto, unido a la baja probabilidad de contaminación a la exactitud de los resultados y a la sencillez y rapidez del método, hace de la RT-PCR una técnica cada vez más utilizada en todos los laboratorios del mundo.

FACTORES QUE REGULAN EL DESARROLLO FOLICULAR II: FOLÍCULOS ANTRALES

José Antonio Velázquez Domínguez y Enrique Mendieta Márquez

Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Biología Molecular y Fisiología Gonadal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Las etapas finales del desarrollo folicular se encuentran reguladas por factores de diversa naturaleza y origen los cuales, a través de la participación de múltiples sistemas de señalización autocrina, paracrina y endocrina, que involucran a todas las estirpes celulares que se encuentran en el folículo, son capaces de llevarlo a través de las etapas de maduración que culminan en la ovulación y su posterior luteinización.

I. Transición folículo secundario a terciario

Apartir de esta etapa, el folículo requerirá forzosamente del estímulo de la hormona estimulante del folículo (FSH) para proseguir la proliferación de las células de la granulosa (CG) y establecer, en éstas, una producción creciente de estrógenos. La acción inductiva de la FSH permitirá, posteriormente, facilitar la respuesta del folículo a la hormona luteinizante (LH) y a otros factores extracelulares [Hillier. *Mol. Cell. Endocrinol.* **179**: 39-46 (2001)].

Algunos productos génicos que aparecen en las CG presentes en los folículos secundarios como resultado de su estimulación por la FSH son, entre otros, el complejo

de la aromatasa, los receptores para FSH (FSHR), LH (LHR) y estrógenos (ER), productos polipeptídicos de la familia del factor de crecimiento y transformación- β , tales como el *GDF9*, las *inhibinas* y las *activinas*, así como la *folistatina*, una proteína que une a estas últimas con una elevada afinidad [Knight & Glistler. *Reproduction* **121**: 503-512 (2001)], además de los *factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF)-I y -II* y las proteínas que lo unen (las *IGFBP*).

A través de mecanismos aún no comprendidos, que podrían involucrar diferencias en cuanto a la sensibilidad de cada folículo a la estimulación gonadotrópica así como su capacidad de producción temprana de estrógenos, se seleccionará uno o a lo sumo un pequeño número de folículos (dominancia folicular) y podrá continuar su desarrollo hasta alcanzar la fase ovulatoria, mientras que los demás folículos (folículos subordinados) detendrán su crecimiento y estarán destinados a sufrir atresia.

Una vez que las CG hayan expresado los FSHR, su proliferación y diferenciación estarán reguladas principalmente por esta gonadotropina, pero dependerán

también de otros factores extrínsecos y de los factores paracrinós producidos localmente, que pueden presentar acciones tanto estimuladoras como inhibitorias. Cabe señalar que los mecanismos de acción de varios de estos factores no se han dilucidado hasta ahora, por lo que sólo discutiremos a continuación la participación de algunos de estos moduladores en el desarrollo folicular.

Así, al inicio de la transición foliculo secundario-terciario, las *activinas* participan en la estimulación de la expresión de los FSHR y de la aromatasa en las CG, inhibiendo a la vez la expresión de los LHR en las CG y en las células de la teca (CT). Conforme las CG continúan su proliferación y el foliculo va completando la formación de su antrum, las concentraciones crecientes de estrógenos incrementarán la síntesis de las *inhibinas* y la *folistatina*, por lo tanto disminuyendo las concentraciones efectivas de *activinas* en el foliculo.

Esta disminución en la concentración de *activinas* en el foliculo antral permitirá la expresión de los LHR en las CG y en las CT, y el incremento en la producción de *inhibinas* promoverá la síntesis *de novo* de andrógenos (principalmente androstendiona) y la expresión de los LHR en las últimas, además de disparar la progresión meiótica en el ovocito detenido en diploteno I, y de regular la síntesis y secreción hipofisaria de FSH a través de mecanismos de retroalimentación negativa [Findlay y cols. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191: 35-42 (2002)].

Diversas estirpes celulares foliculares parecen jugar un papel clave en el establecimiento del patrón heterogéneo de expresión que se observa en las CG de foliculos terciarios, ya que las CG murales, en contacto directo con una lámina basal y alejadas del ovocito, sintetizarán el LHR, mientras que las células del cúmulo, en contacto con éste, prácticamente no lo harán. Algunos mecanismos de regulación que se han propuesto para explicar este fenómeno incluyen la participación del *GDF9* como un regulador negativo de la transcripción de LHR en células del cúmulo, la intervención del *KL*, el *factor de crecimiento epidermal (EGF)* y algunos componentes de la matriz extracelular como promotores de la expresión del LHR y de la proliferación celular en las CG murales.

Por otra parte, la expresión plena del fenotipo de las CG parecería contribuir a la regulación funcional de las CT y, en consecuencia, al mantenimiento de un adecuado funcionamiento del foliculo. En este sentido, se ha observado que la FSH estimula en las CG la producción de *IGF-I*, el cual incrementa, a su vez, la producción tecal de andrógenos y, finalmente, la síntesis de estrógenos por las mismas CG. Se ha observado que las concentraciones bioactivas de *IGF-I* son mayores en los foliculos dominantes que en los subordinados lo que, al parecer, reflejaría los niveles de *IGFBPs* presentes en cada foliculo y plantearía una posible explicación de los factores que definen el potencial esteroideogénico de los foliculos y el fenómeno de dominancia folicular en el ovario [Richards, *Endocrinology* 142: 2184-2193 (2001)].

Finalmente, varios de los factores producidos localmente son importantes para la supervivencia de los foliculos antrales tempranos. Estos factores pueden actuar

sobre las CG (p. ej., esteroides), las CT (p. ej. *IGF-I*) o del ovocito (p. ej., *activinas*), permitiendo al foliculo dominante pasar a foliculo preovulatorio o de Graaf [Markström y cols. *Reproduction* 123: 23-30 (2002)].

II. Transición foliculo terciario-foliculo de graaf

La ovulación se dispara con el pico preovulatorio de LH, el cual, a su vez, se induce por la elevada concentración circulante de estrógenos producidos por el foliculo preovulatorio. Este pico induce marcados cambios en el foliculo que incluyen tanto la reiniciación de los procesos de maduración del ovocito como alteraciones funcionales en el complejo ovocito-células del cúmulo, modificaciones en la expresión génica de las CG que las llevarán hacia la luteinización y otros cambios que provocarán la ruptura de la pared folicular.

El ovocito maduro secreta un factor que permite la expansión de las células del cúmulo (*CEEF*) que permite secretar ácido hialurónico en respuesta a la estimulación por FSH. Al hidratarse genera espacios entre las células que provocan la expansión del cúmulo que precede al proceso de ovulación propiamente dicho. Algunos autores han señalado que la expresión de la enzima hialuronano sintasa 2, responsable de la síntesis de este glucosaminoglucano, parece depender de algunos factores previamente identificados como productos de secreción de los ovocitos (p. ej., *GDF9*) [Eppig. *Reproduction* 122: 829-838 (2001)].

Los productos proinflamatorios sintetizados por las CG y detectados en elevadas concentraciones en los foliculos preovulatorios (p. ej., *interleucinas [IL]-1 β* y *-6*, *factor de necrosis tumoral [TNF]- α* y *prostaglandinas [PG]*) contribuyen a la disminución de su producción de estrógenos hacia el final de la transición a foliculo de Graaf. Este cambio en el patrón esteroideogénico de las CG parece inducir, junto con la aparición del pico preovulatorio de LH, la expresión de las enzimas remodeladoras de tejidos (*metaloproteinasas de matriz [MMPs]*) indispensables para el proceso de ovulación [Rosenfeld y cols. *Reproduction* 122: 215-226 (2001)].

Varios tipos de MMP participan en el proceso de ruptura folicular, entre ellas, enzimas con capacidad de degradar colágeno, elastina, proteoglucanos y otros elementos de matriz extracelular, que se encuentran presentes en foliculos preovulatorios de ovarios de rata y cabra. El incremento periovulatorio en la actividad colagenolítica se atribuye a aumentar la expresión de los mRNA de la colagenasa intersticial y la colagenasa-3 en las CG de foliculos de Graaf de rata y bovino. Otras enzimas cuya expresión se induce en las CG son las gelatinasas, que participan también en la degradación de la membrana basal que separa a las CG y a las CTI [Van Voorhis B.J. *Encyclopedia of Reproduction II*: 376-389 (1999)].

La regulación de la actividad de las MMP y de otras proteasas en el foliculo ocurre a través de un mecanismo dependiente de activadores específicos, los cuales controlan el paso de los zimógenos a las formas catalíticas. Un ejemplo de regulador positivo de la actividad de las MMP es el *activador de plasminógeno del tipo urocinasa (uPA)*, activador de varias colagenasas y gelatinasas,

producido por las células del cúmulo. La síntesis del uPA parece inhibirse por el ovocito durante la etapa de folículo terciario, y esta inhibición desaparece una vez que se ha presentado el pico preovulatorio de LH.

Finalmente, se ha sugerido que el ovocito produce un factor anti-luteinizante que previene la diferenciación terminal de las CG, manteniendo activa su síntesis

de estrógenos en detrimento de su producción de progesterona. Este bloqueo biosintético desaparece una vez que se ha presentado el pico preovulatorio de LH, que parece hacer resistentes las CG a la inhibición de su diferenciación. Por lo tanto, una vez que el ovocito se ha liberado, las CG murales y las CT concluirán su proceso de rediferenciación para dar origen a las células lúteas.

RNAi: LA REVOLUCIÓN SILENCIOSA

Alejandro Ruiz Moreno* y Ramón Muñoz-Chápuli#

* *Estudiante de Biología, Universidad de Málaga.*

Catedrático de Biología Animal, Universidad de Málaga

Suele suceder con las revoluciones que sus protagonistas casi nunca son conscientes de ellas. Probablemente ni los colonos que arrojaron el té inglés a las aguas del puerto de Boston en 1773 ni los parisinos que asaltaron la Bastilla pocos años después pensaron que aquello era algo más que un tumulto. Probablemente no sospecharon que estaban cambiando la Historia. Con las revoluciones científicas a veces sucede lo mismo. Es posible que desde hace unos pocos años estemos viviendo una casi sin darnos cuenta. Por eso podría llamarse «silenciosa». Por eso, y también porque se basa en los sistemas de silenciamiento génico o «interferencia por RNA» (RNAi), un recientemente descubierto mecanismo de control de la expresión génica que se ha revelado universal en los eucariotas y que podríamos utilizar con objetivos científicos y terapéuticos.

La historia comenzó hace tan sólo seis años, cuando un grupo de embriólogos del Instituto Carnegie de Washington estaba estudiando en *Caenorhabditis elegans* la interferencia que se produce en la expresión génica mediante la introducción de RNA antisentido en las células [Fire et al., *Nature* **391**:806-11 (1998)]. Desde 1990, y gracias a estudios en las plantas, se conocía que la unión de moléculas antisentido de DNA o RNA al mRNA bloqueaba su traducción. Lo original del estudio del grupo del Carnegie consistió en introducir en las células RNA de doble cadena (es decir, sentido y antisentido hibridados). La sorpresa debió ser grande cuando comprobaron que el efecto de silenciamiento génico era mucho más potente que con RNA de cadena sencilla, contra lo que cabría esperar. Aún más sorprendente fue constatar que la estequiometría del proceso no coincidía con la idea de un simple bloqueo del mRNA por hibridación. Unas pocas moléculas de RNA de doble cadena bastaban para silenciar la expresión génica a pesar de la cantidad mucho mayor de mRNA existente en la célula. Los autores ya apuntaron a la existencia de un mecanismo amplificador o catalítico de naturaleza desconocida.

Aunque el silenciamiento génico presenta diferencias en animales frente a hongos y plantas, el proceso y sus «actores» moleculares son básicamente los mismos. La vía normal, fisiológica, de silenciamiento comienza cuando se expresa un pre-miRNA (*precursor micro-RNA*), una cadena sencilla que puede plegarse y formar

una horquilla de doble cadena denominada miRNA. Otra posibilidad es la aparición de RNA de doble cadena que puede proceder de virus o transposones. En ambos casos estas cadenas dobles de RNA son cortadas por una enzima denominada Dicer en pequeños fragmentos (19 a 24 nt) de doble cadena con extremos 3' salientes (2-3nt) denominados siRNAs (*short interfering RNA*). La caracterización de Dicer [Bernstein et al., *Nature* **409**:363-6 (2001)] permitió identificarla como una RNAsaIII así como localizar en su estructura un dominio de unión a RNA de doble cadena.

Los siRNA producidos por Dicer se asocian con un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), activándolo y manifestando una actividad helicasa que separa las dos hebras dejando solo la hebra antisentido asociada al complejo. El complejo ribonucleoproteico resultante se une al mRNA diana. Si la complementriedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si es perfecta, RISC actúa como RNasa, cortando al mensajero y quedando libre para repetir el proceso. Esto es lo que explica que un número pequeño de moléculas de siRNA puedan destruir un número mucho mayor de mRNA.

El estudio de las vías de silenciamiento génico mediadas por miRNA ha permitido descubrir nuevos e inesperados fenómenos que aún no se conocen en profundidad. Uno de los más sorprendentes es el del RNAi transitivo, que se ha observado en plantas, hongos y *C. elegans*. Este fenómeno consiste en que la molécula de siRNA provoca, tras el corte del mRNA diana, la síntesis de nuevos siRNA a partir de secuencias que están en dirección 5' del punto de corte, con lo que se amplifica la señal. El fenómeno necesita RNA polimerasas dirigidas por RNA, un tipo de enzimas que, aparentemente, no existen ni en *Drosophila* ni en el genoma humano. Esto es importante por razones que veremos luego.

Hasta hace muy poco se pensaba que RISC era un complejo multiproteico de componentes desconocidos. Los análisis señalaban la familia de proteínas Argonauta, una familia muy conservada en todos los eucariotas, cuyos miembros se presentan en un número variable en cada especie. Era conocido que algunas mutaciones en los integrantes específicos de esta familia causaban defectos en procesos también específicos y en ocasiones muy

interesantes. Es el caso de uno de los más conocidos representantes de las Argonautas, la proteína Piwi de *Drosophila*, fundamental para la generación de las señales moleculares que se generan en el nicho de las GSC (*germ-line stem cells*) [Lin y Spradling, *Development* **124**: 2463-76 (1997)]. En éste y en muchos de estos procesos se descubrió que la alteración se producía en procesos específicos de silenciamiento. Sin embargo no se pudo determinar cuál era el papel real de las Argonautas en el proceso, hasta que en septiembre de 2004 la revista *Science* publicó la estructura tridimensional de un homólogo de Piwi [Joshua-Tor et al., *Science* **305**:1434-7. (2004)]. Estos autores mostraron la homología estructural entre un dominio común de las Argonautas, el dominio Piwi, y un dominio de una RNAsa, la ribonucleasa H, concluyendo que los integrantes de la familia Argonauta eran precisamente los RISC, al menos en sus actividades más importantes, lo cual no descarta la posibilidad de que participen otros péptidos con funciones accesorias.

El número de la revista *Nature* de la semana del 11-17 noviembre 2004 dedica una atención especial al tema RNAi, incluyendo una estupenda animación sobre el silenciamiento génico (<http://www.nature.com/focus/rnai/animations/>). Incluye dos artículos en los que se profundiza en los mecanismos de génesis y procesamiento de los miRNA. En ellos se pone de manifiesto la existencia de dos complejos multiproteicos, uno formado por RNA-helicatas, proteínas asociadas a RNA y otras ribonucleoproteínas, y otro complejo denominado «microprocesador» al que pertenecen las proteínas Drosha (una RNAsa tipo III) y Pasha. [Denli et al., *Nature* **432**:231-235 (2004); Gregory et al., *Nature* **432**:235-240 (2004)]. El complejo microprocesador, situado en el núcleo celular, reconoce y corta los transcritos primarios denominados «miRNA primitivo» que pueden tener una longitud comprendida entre varios cientos y varios miles de bases. Así se generan los miRNA, cadenas en horquilla de unos 70 nucleótidos que serán procesados por Dicer.

Las funciones fisiológicas conocidas que tiene el sistema RNAi son muy variadas. Por una parte el sistema funcionaría como un sistema de defensa contra virus, control de transposones o elementos génicos anómalos. Los propios virus han aprendido la lección y algunos de ellos expresan supresores del sistema RNAi, tratando de inhibir la respuesta defensiva. Un ejemplo de silenciamiento dirigido contra transposones, es la que se da en *C. elegans* donde normalmente se observa un control estricto de su actividad con la consiguiente estabilidad genómica. En cambio se ha comprobado que determinadas cepas deficientes en elementos del sistema RNAi muestran una gran movilidad de transposones [Tabara et al., *Cell* **99**:123-32 (1999); Ketting et al., *Cell* **99**: 133-141 (1999)]. Por otro lado la formación de miRNA se ha revelado como un mecanismo importante en la regulación de la expresión génica endógena, y numerosos casos lo han puesto de manifiesto en diferentes organismos. Se sabe que en *Drosophila*, el silenciamiento se relaciona con mecanismos de regulación de la proliferación, muerte celular y el metabolismo de las grasas [Hay et al., *Curr.*

Biology **13**:790-795 (2003)]. Otros ejemplos serían el control de la asimetría neuronal izquierda/derecha en nemátodos [Johnston and Hobert., *Nature* **426**:845-9 (2003)], la modulación de la diferenciación de la línea hematopoyética en mamíferos [Bartel et al., *Science* **303**:83-6 (2004)], o el control del desarrollo de la hoja y la flor en plantas [Moussian et al., *EMBO J.* **17**:1799-809.(1998)]. Aunque probablemente la interferencia participe en otros procesos en los que aún no ha sido descrita, hay que anotar la estrecha relación que existe con los procesos de desarrollo y con los mecanismos de mantenimiento y diferenciación de las células madre, proceso que podría estar modulado de alguna forma por las proteínas Argonauta como sucede en *Drosophila*. Así, los ratones genosuprimidos (*knock-out*) para el gen *Dicer1* no pueden procesar los miRNA, mueren muy pronto y carecen de células madre. Por tanto el sistema RNAi se revela como esencial para el mantenimiento de la población de células madre embrionarias por medio de mecanismos que no conocemos [Bernstein et al. *Nat. Genet.* **35**:215-217 (2003)].

La siguiente cuestión es ¿podemos utilizar el sistema RNAi en nuestro beneficio? Los primeros intentos de silenciar genes específicos introduciendo en las células RNA de doble cadena funcionaron bien en *C. elegans* y *Drosophila*, pero fracasaron en células de mamíferos. La respuesta mediada por interferón ante la presencia de cualquier RNA de doble cadena mayor de 30 pares de bases bloqueaba de forma no específica toda la traducción de los mRNA [Elbashir et al., *Nature* **411**:494-498 (2001)]. Sin embargo, a partir de esa fecha, los siRNA de 19-22 pares de bases, que no provocan la respuesta mediada por interferón, se revelaron útiles para silenciar genes específicos en mamíferos. Desde entonces los resultados se han sucedido, sobre todo en experiencias *in vitro*, mostrando como siRNAs son capaces de silenciar el alelo oncogénico *K-Ras* (V12) en células tumorales, inhibiendo su tumorigenicidad [Brummelkamp et al., *Cancer Cell* **2**: 243-247 (2002)]. También se han silenciado con éxito los mRNA procedentes del genoma del virus HIV-1 [Lee et al., *Nature Biotechnol.* **20**:500-5 (2002)] o que codifican correceptores esenciales para la entrada de este virus en los linfocitos T, disminuyendo de forma efectiva el número de células infectadas [Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:183-8 (2003)]. Incluso el producto génico de la reorganización génica BCR/ABL, implicada en leucemias crónicas y agudas, se ha inhibido provocando apoptosis de las células leucémicas [Wilda et al., *Oncogene* **21**: 5716-5724 (2002)].

Saliendo del campo de aplicaciones terapéuticas, el sistema RNAi nos proporciona una potente herramienta para estudiar la función celular de determinados genes, que podemos silenciar a voluntad, incluso en transgénesis. La posibilidad de silenciar de forma permanente un gen determinado en células ES (células madre embrionarias) y luego en la línea germinal permite obtener ratones cuya progenie mantiene dicho silenciamiento [Carmell et al., *Nat. Struct. Biol.* **10**:91-92.(2003)], reduciendo mucho el tiempo y el esfuerzo que ahora son necesarios para

obtener líneas de ratones genosuprimidos. Mas lejos aún llegan los que ya aplican la interferencia como herramienta para identificar genes esenciales en procesos celulares. Así se ha hecho en los estudios realizados para determinar los genes cuya expresión sea indispensable para la división celular [Kittler et al., *Nature* **432**:1036-1040 (2004)]. Esta técnica está basada en la generación de una colección de esiRNA (*endoribonuclease-prepared short interfering RNA*) con capacidad para inhibir 15497 genes humanos.

Por otra parte se han desarrollado técnicas para producir siRNA de forma económica, por ejemplo a partir de plásmidos diseñados para expresar una cadena sencilla de RNA con las secuencias sentido y antisentido separadas por un espaciador que permite que la cadena adopte la configuración en horquilla, susceptible de ser procesada por Dicer para dar los siRNA. También se ha ensayado la producción de RNA largos de doble cadena que pueden ser procesados *in vitro* por Dicer u otras RNAsas de tipo III para formar un cocktail de varios siRNA.

Pero el gran resultado con el que queremos terminar este artículo es el obtenido por un grupo de investigadores de los laboratorios farmacéuticos Alnylam, una nueva empresa dedicada fundamentalmente a las aplicaciones del sistema RNAi, cuyo lema corporativo es algo así como «organizando una revolución en Biología para la salud humana» (www.alnylam.com). En este artículo se muestra, por primera vez, el silenciamiento terapéutico de un gen en ratones por administración intravenosa de siRNA modificados [Soutschek et al., *Nature* **432**:173-178 (2004)]. El gen diana elegido fue el de la apolipoproteína-B, un componente esencial de la formación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que son las que aumentan en casos de hipercolesterolemia. Niveles séricos altos de Apo-B son, por tanto, un factor de riesgo cardiovascular. La idea (genial por su simplicidad) de los autores de este estudio fue utilizar una pequeña modificación química

de los siRNA que los hacía más estables y, sobre todo, conjugar una molécula de colesterol en el extremo 3' de la cadena sentido. Esto consiguió 1) unir la albúmina sérica, permitiendo una liberación muy lenta y retardando su eliminación por los riñones, y 2) dar la hidrofobicidad necesaria para atravesar la membrana celular y entrar en las células en múltiples órganos, como hígado, corazón, riñones y pulmones. Felizmente para los investigadores, la presencia de los siRNA en los hepatocitos y en el intestino, las principales células que sintetizan Apo-B, causó una fuerte reducción en la expresión de este gen y un significativo descenso en los niveles circulantes de Apo-B, LDL y colesterol total. El efecto fue específico e implicó la activación del sistema endógeno de silenciamiento génico. Este resultado muestra el primer caso de silenciamiento sistémico de un gen endógeno de mamífero por medio de un mecanismo mediado por el RNAi.

Es posible que todo esto sea contemplado en perspectiva histórica como el inicio de una revolución científica y terapéutica, pero aún hay que ser muy prudentes. Probablemente no existen precedentes de una transición tan rápida desde el descubrimiento de un nuevo mecanismo biológico a los primeros intentos de aplicación terapéutica (¡menos de seis años!). Es mucho lo que aún desconocemos de los sistemas de control génico mediados por RNAi. Por ejemplo, la cuestión de la dosificación puede ser esencial. El sistema RISC parece ser saturable, por lo que un exceso de siRNA podría bloquear su función normal, causando un descontrol en la expresión de muchos genes esenciales. También es preciso saber si existe un sistema de amplificación de la respuesta que la pudiese convertir en no específica, bloqueando la expresión de unos genes necesarios para el funcionamiento normal de la célula. Por último, será necesario afinar mucho el mecanismo de entrega «a domicilio» de los siRNA, evitando en lo posible que penetre en células que no son diana. Pero a pesar de todo esto, las expectativas no pueden ser más excitantes...

